

皮膚感作性試験の精鋭化に向けた
マウス樹状細胞株の応用と新規抗原性獲得機構の解明

白石 絵里奈

2021 年

目次

緒論.....	1
第 1 章 マウス樹状細胞株 DC2.4 細胞の皮膚感作性試験への適用に関する検討.....	6
第 1 節 緒言.....	6
第 2 節 DC2.4 細胞の抗原性検出能評価.....	8
第 3 節 考察.....	13
第 2 章 ブラジル産グリーンプロポリス (BGP) を用いた DC2.4 細胞皮膚感作性試験の有用性評価.....	16
第 1 節 緒言.....	16
第 2 節 THP-1 細胞および DC2.4 細胞を用いた BGP の抗原性評価.....	18
第 3 節 LLNA による BGP の皮膚感作性評価.....	24
第 4 節 考察.....	30
第 3 章 MUP22 を介した新規抗原性獲得機構の解明.....	33
第 1 節 緒言.....	33
第 2 節 MUP22 とハプテンの結合性評価.....	36
第 3 節 <i>Mup22</i> -Tg マウスの性状解析.....	40
第 4 節 抗原提示細胞のリンパ節移行に与える <i>Mup22</i> 高発現の影響.....	43
第 5 節 <i>Mup22</i> 高発現が皮膚感作感受性に与える影響.....	46
第 6 節 考察.....	49
総括.....	54
実験材料および方法.....	55
参考文献.....	78
謝辞.....	84

緒論

接触皮膚炎は、特定の物質に直接接触することで皮膚に炎症が起きる疾患である。アレルギー性接触皮膚炎は接触皮膚炎の一つに分類されており、化学物質が皮膚に触れて起こるアレルギー反応の総称である[1]。アレルギー性接触皮膚炎は、ハプテンと呼ばれる分子量 1000 以下の低分子の化学物質に繰り返し曝露されることで発症する遅発性のIV型アレルギー反応であり[2]、その主な症状には、紅斑、発疹、丘疹、そう痒症等がある[3]。アレルギー性接触皮膚炎はヨーロッパ人口の 27%が罹患しており [4]、また世界で報告される職業性皮膚炎の約 50%と職場疾患の約 5 分の 1 を占めていることから[5]、発症頻度が高い疾患である。これまではアレルギー性接触皮膚炎は、特定の原因に曝露される機会の多い職業性のものが多く問題となっていたが、近年は化粧品のような日常生活に使用されるものの中にも原因物質が存在する場合があることが報告されており[6]、誰にでも起こり得る疾患であることから注目されている。また臨床において、疑いのある物質に対してアレルギー性接触皮膚炎を誘導するかどうかの確定診断はパッチテストによる診断のみであり、原因物質の特定を行わない限り予防することが困難であることが問題となっている。この問題を解決するためには、化学物質が使用される前に皮膚感作性の正確な評価とリスク管理を行うことで、アレルギー性接触皮膚炎の発症を未然に防ぐことが重要である。

現在、化学物質が使用される前に行われる皮膚感作性試験には、動物を使用した試験が最終判断(確定試験)に用いられている。一方で動物実験は、高額な費用を要することや動物愛護の観点から、実験数の削減が世界的に求められている。EUでは2013年に、EU域内で販売される化粧品成分の安全性に関する動物実験を全面的に禁止することを決定しており[7, 8]、日本でも資生堂や花王といった大手の化粧品メーカーでは既に、医薬部外品を含む化粧品の開発に際し動物実験を廃止している[9, 10]。さらに米国環境保護庁では、農薬登録の際に行われる皮膚感作性に関する安全性評価のための動物実験は、2025年には30%削減し2035年には全面的に禁止することが目標として掲げられている。すなわち、現在皮膚感作性の確定試験として行われている動物実験が、将来的には実施が困難になる状況が予想される。このことから、実験動物を用いずに高い精度で化学物質の皮膚感作性を検出できる代替法の構築が世界的に急務である。

こうした世界的な動きから、動物を使用しない代替法の構築に向けた研究が活発に行われており、経済協力開発機構(Organization for Economic Co-operation and Development; OECD)では皮膚感作における有害性発現経路(Adverse outcome pathway; AOP)の開発が進められてきた。AOPとは、化学物質が惹き起こす有害事象に対して、分子レベルの初期事象(Molecular initiation event; MIE)から始まる、細胞レベル、組織レベル、個体レベルの各段階で認められるそれぞれの重要事象

(Key event: KE) を結び付けて有害事象発現までを経路として示したものであり、AOP を明確化し理解することで発症機序に基づいた効率的な化学物質の毒性試験系構築の基盤になると期待されている(Figure 1)。前述の通り皮膚感作性試験の動物実験代替法の構築が急務であるという背景から、毒性影響の中でも皮膚感作性における AOP の解明は特に進んでおり、2012 年に OECD ガイダンス文書として公表されている[11]。皮膚感作における AOP は 4 つの KE から構成されている(Figure 2)。すなわち化学物質のタンパク質への結合の段階である KE1、ケラチノサイトの活性化の段階である KE2、樹状細胞(DC)の活性化の段階である KE3、T 細胞の活性化と増殖の段階である KE4 である。

Local Lymph Node Assay (LLNA) は、OECD テストガイドライン(TG)429 に収載されているマウスを用いた *in vivo* 試験法であり、皮膚感作性の確定試験として位置づけられている。また皮膚感作における AOP において、LLNA は KE4 を検出する試験法として位置づけられているが、これに代わる *in vitro* 試験法はまだ開発されていないのが現状である。一方で、KE1-KE3 それぞれに対応する *in vitro* 試験法としては、KE1 に該当する Direct peptide reactivity assay (DPRA, OECD TG 442C)、KE2 に該当する ARE-Nrf2 Luciferase LuSens Test Method (LuSens test method, OECD TG 442D)、KE3 に該当する human cell line activation test (h-CLAT, OECD TG 442E)が既に動物実験代替法として確立されている。代替法は単独では正確度が

不十分であることが公言されており、複数の代替法を組み合わせるバッテリー試験により、検出精度を向上させて動物実験に置き換えようという Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) の概念が構築されつつある。代替法による試験結果は確定試験で得られた結果と完全に一致することが求められているものの、現行の代替法では確定試験である LLNA と比較した際に 15–20% もの化学物質を正しく検出できないことから問題となっている。正しく検出できない化合物のうち特に偽陰性となる場合は、その化学物質がヒトに対して使用された際に健康被害を生じるリスクがある可能性を示しており、見逃すことは許されない。従ってこれらの代替法をそのまま動物実験に置き替えるのは現状では困難である。この課題を解決するためには、偽陰性が疑われる際に正しく陽性と検出できるような試験法を開発することが必要不可欠である。そこで本研究では、既存の試験法の問題点解決に向けた研究を行うことで、皮膚感作性代替法の精度向上を目指した。

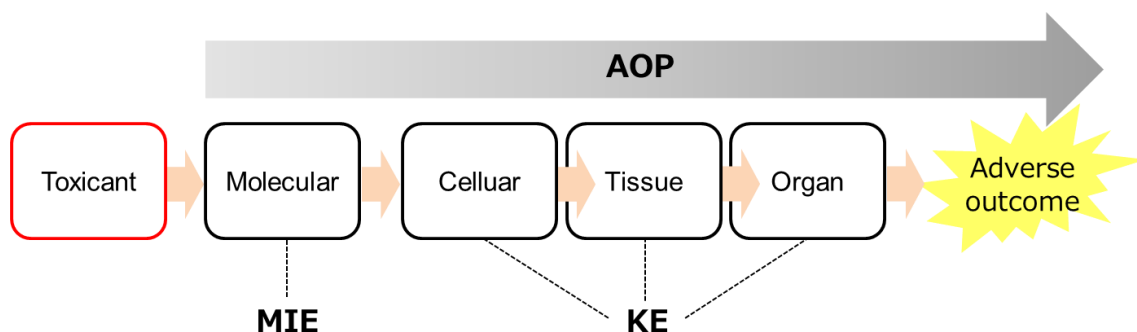


Figure 1. Conceptual diagram of Adverse outcome pathway (AOP) and key events (KE). MIE; Molecular initiation event.

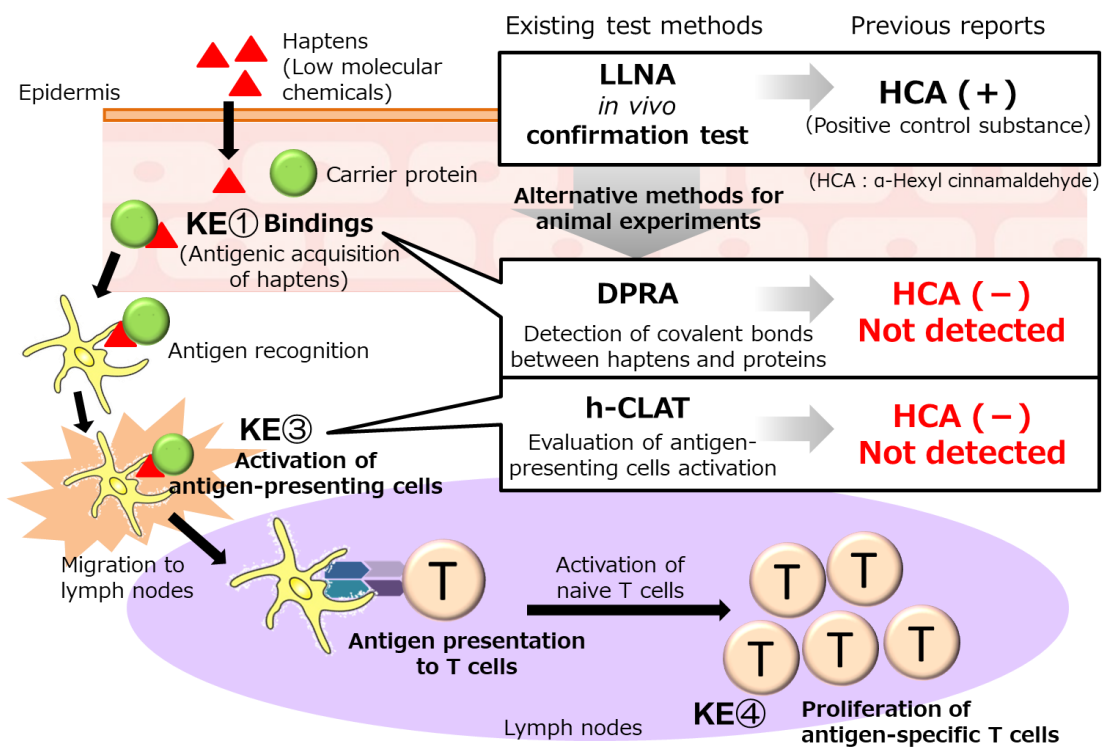


Figure 2. Induction mechanism of allergic contact dermatitis and existing skin sensitization test methods.

第1章 マウス樹状細胞株 DC2.4 細胞の皮膚感作性試験への適用に関する検討

第1節 緒言

h-CLAT は、皮膚感作 AOP の KE3 に該当する代替法であり (Figure 2)、ヒト単球性白血病由来細胞株 (THP-1 細胞) を用いて細胞表面分子の発現量を評価する試験法である。THP-1 細胞は抗原を認識すると活性化して、細胞の表面に発現している T 細胞共刺激因子である表面分子 CD54 および CD86 の発現量が上昇することから、この発現上昇度を指標に感作性を評価する試験法である。しかし h-CLAT は、確定試験である LLNA の代替法であるにもかかわらず、LLNA における推奨陽性対照物質である α -hexyl cinnamaldehyde (HCA) の感作性を検出することができないことが問題となっている [12, 13]。さらに h-CLAT と LLNA の結果と比較した場合、皮膚感作性の正確度は 85% (N=142) に留まっており、h-CLAT では被験物質のうち 15% が正しく評価できていないという状況である。この原因として、THP-1 細胞を用いることで脂溶性のものを偽陰性と判定してしまう場合があること [12, 13] と、THP-1 細胞は誘導処理を行わない限り抗原提示能の高い DC 様細胞には分化せず未分化な単球細胞として作用すること [14] が考えられる。そこで我々は、成熟 DC 株であるマウス樹状細胞株 (DC2.4 細胞) を用いることで、THP-1 細胞では検出できない被験物質も検出できるのではないかと仮説を立てた。本章では、h-CLAT における細胞株を、既存法で用いられる THP-1

細胞から DC2.4 細胞に変更することにより、h-CLAT に代わる試験法としての DC2.4 細胞の有用性を検証した。

第 2 節 DC2.4 細胞の抗原性検出能評価

DC2.4 細胞を用いて、感作強度の異なる代表的な 3 種類のハプテン、HCA(軽度感作性物質)、2-mercaptobenzothiazole (MBT, 中等度感作性物質)、2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB, 極強度感作性物質)の抗原性評価を行った。基本的には OECD TG 442E に記載されている h-CLAT に準じて行った。h-CLAT の手順は、第一段階の用量設定試験と、第二段階の本試験の 2 つの段階から構成される。まず、第一段階の用量設定試験を行い、75%細胞生存率となる際の濃度(CV75)の決定を試みた。DC2.4 細胞を DNCB、MBT、HCA で刺激したところ、用量依存的な細胞生存率の低下が認められた(Figure 3)。さらに(式 1：実験材料および方法 1-3 を参照)に従って CV75 を算出したところ、DNCB、MBT、HCA の CV75 はそれぞれ 6.07、120.14、118.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となった。

上記の化学物質に対する DC2.4 細胞の活性化を評価するため、DC2.4 細胞を上記で求めた CV75 以下の濃度の各ハプテンで 24 時間処理した後、FACS Verse により細胞表面の CD54 および CD86 の発現量を評価した(Figure 4–5)。その結果、CD54、CD86 の平均蛍光強度(mean fluorescence intensity, MFI)値は、コントロールと比較して、各被験物質の用量依存的に増加することが明らかとなった(Table 1)。さらに CD54、CD86 の相対蛍光強度(Relative fluorescence intensity, RFI)の値も、各被験物質の用量依存的に増加した(Figure 5, Table 1)。DC2.4 細胞を

DNCB 2.0 および 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で処理した場合と、MBT 35 および 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で処理した場合には、いずれの場合も CD54 と CD86 両方の RFI 値が溶媒処理に比べ有意に増加した($P < 0.05$)。また、HCA 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で処理した場合には、CD54 と CD86 の両方の RFI 値が有意に上昇した($P < 0.01$)が、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の HCA では CD54 の RFI 値は上昇せず、CD86 の RFI 値が有意に上昇した($P < 0.05$)。上記の試験濃度で DNCB、MBT、HCA を処理した場合の細胞生存率は、81.5–96.2%であり、本試験においても細胞生存率が 75%以上となっていることを再度確認した (Table 1)。これらの結果から DC2.4 細胞は、被験物質の抗原性を検出することが可能であり、各ハプテンの抗原性は DNCB \gg MBT \gg HCA の順に低下することが示された。またこれは LLNA が示す順序と一致していた。以上より DC2.4 細胞を使用した方法(DC2.4 細胞皮膚感作性試験)は、代表的なハプテンを用量依存的かつ感作強度依存的に検出することができ、さらに h-CLAT で検出できなかった HCA も検出できたことから、抗原性評価において有用であることが示された。

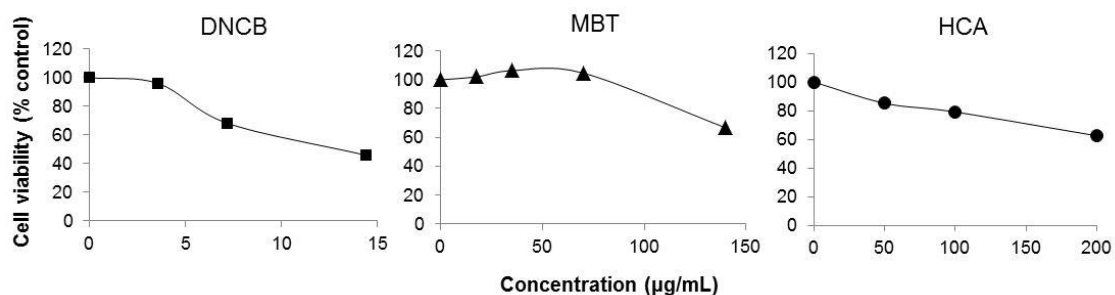


Figure 3. Evaluation of cell viability of each hapten against DC2.4 cells. DC2.4 cells were treated with 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), 2-mercaptobenzothiazole (MBT) or α -hexyl cinnamaldehyde (HCA) for 24 h, and then cell viability was measured by WST-1 assay. Results were expressed as means for duplicate cultures.

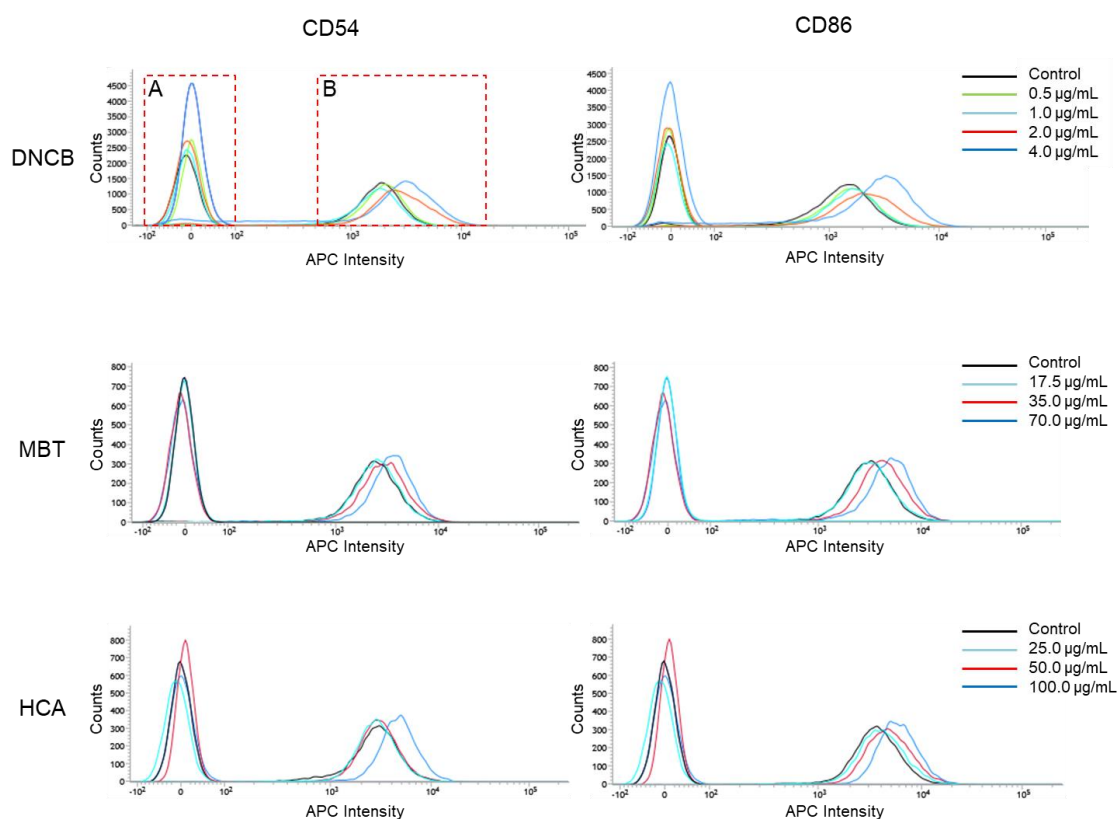


Figure 4. Histograms showing CD54 and CD86 expression after treatment with 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), 2-mercaptobenzothiazole (MBT), or α -hexyl cinnamaldehyde (HCA). DC2.4 cells were cultured for 24 h and then treated with DMSO (control), DNCB, MBT, or HCA. After 24 h, expression levels of CD54 and CD86 on the cell surface were measured by means of flow cytometry, staining without (A) or with (B) each biotin-conjugated specific antibody. The figure shows representative data from three independent experiments.

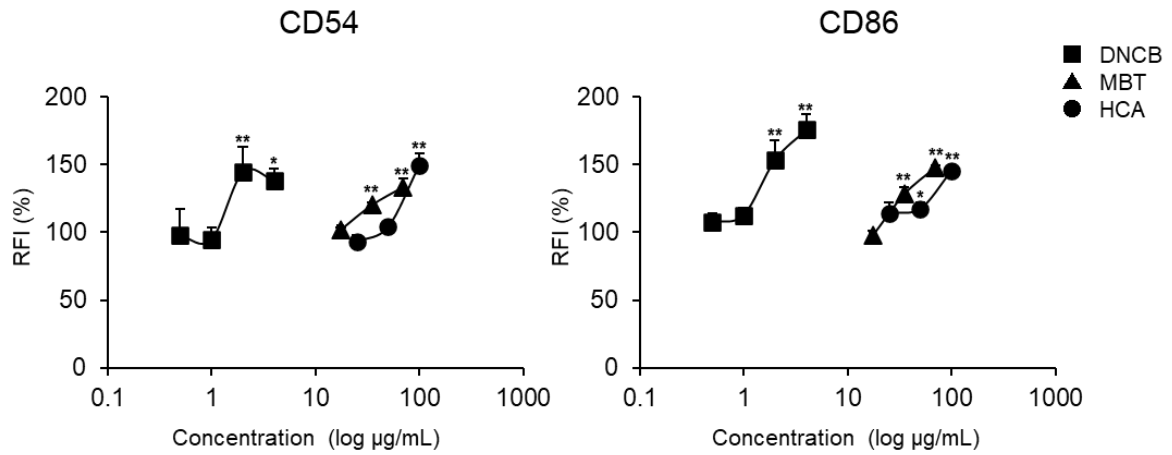


Figure 5. Effect of treatment with 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), 2-mercaptobenzothiazole (MBT), or α -hexyl cinnamaldehyde (HCA) on CD54 and CD86. Changes in CD86 and CD54 expression after treatment with the three chemicals for 24 h were indicated as relative fluorescence intensity (RFI) values. RFI values were calculated from the geometric means of the raw data obtained by flow cytometry (see materials and methods 1-4 Equation 2). Results were expressed as means and standard deviations for triplicate cultures. *; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$ vs RFI of control group (0 µg/mL), as indicated by Dunnett's multiple comparisons test.

Table 1. Test chemicals used

Chemical name (CAS No.)	Potency category (EC3 from LLNA ¹)	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	MFI ²		RFI ²		Cell viability (%) ²
			CD54	CD86	CD54	CD86	
2,4- Dinitrochlorobenzene (97-00-7)	Extreme (0.05 %)	0	1893 ± 89	1553 ± 95	100 ± 4.7	100 ± 6.1	93.8 ± 1.6
		0.5	1850 ± 376	1674 ± 100	98 ± 19.9	108 ± 6.5	94.8 ± 1.2
		1	1790 ± 174	1751 ± 77	95 ± 9.2	113 ± 4.9	94.9 ± 2.2
		2	2735 ± 356	2379 ± 228	144 $\pm 18.8^{**}$	153 $\pm 14.7^{**}$	94.1 ± 1.3
		4	2614 ± 166	2727 ± 180	138 $\pm 8.7^*$	176 $\pm 11.6^{**}$	84.3 ± 4.2
2- Mercaptobenzothiazole (149-30-4)	Moderate (1.7 %)	0	2651 ± 56	3461 ± 32	100 ± 2.1	100 ± 0.9	97.2 ± 0.5
		17.5	2709 ± 32	3399 ± 106	102 ± 1.2	98 ± 3.1	96.2 ± 1.2
		35	3188 ± 52	4436 ± 164	120 $\pm 2.0^{**}$	128 $\pm 4.7^{**}$	95.0 ± 0.3
		70	3534 ± 173	5114 ± 53	133 $\pm 6.5^{**}$	148 $\pm 1.5^{**}$	81.5 ± 1.4
α -Hexyl cinnamaldehyde (101-86-0)	Weak (11 %)	0	3212 ± 124	4514 ± 385	100 ± 3.9	100 ± 8.5	94.2 ± 0.3
		25	2986 ± 167	5161 ± 351	93 ± 5.2	114 ± 7.8	92.5 ± 1.2
		50	3342 ± 38	5305 ± 186	104 ± 1.2	118 $\pm 4.1^*$	92.6 ± 1.1
		100	4804 ± 274	6546 ± 42	150 $\pm 8.5^{**}$	145 $\pm 0.9^{**}$	85.0 ± 1.6

Abbreviations: LLNA, local lymph node assay; MFI, geometric mean fluorescence intensity; RFI, relative fluorescence intensity.

¹; LLNA data for the test chemicals is adapted from Nukada *et al.* 2012.

²; Results are expressed as the mean \pm 1 S.D. of triplicate cultures.

*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$ vs RFI of control group (0 $\mu\text{g/mL}$), Dunnett's multiple comparisons test.

第3節 考察

本検討により、DC2.4 細胞皮膚感作性試験は感作強度の異なるハプテンを用量依存的かつ感作強度依存的に評価できたことから、被験物質の抗原性検出において有用であることが示された。h-CLAT は脂溶性の化合物をしばしば偽陰性として評価してしまうことがこれまでに報告されており[12, 13]、HCA もその一つである。一方で DC2.4 細胞皮膚感作性試験では HCA を検出することができた。このことから DC2.4 細胞皮膚感作性試験を用いることで、h-CLAT で問題となっていた脂溶性物質が偽陰性と判定される問題を解決できる可能性が示された。

今回の THP-1 細胞を用いた h-CLAT と DC2.4 細胞皮膚感作性試験との結果の違いは、両者の抗原提示能の差が原因として考えられる。THP-1 細胞は DC の前駆細胞としての性質を有しているが、特殊な培養条件下、すなわち顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、腫瘍壊死因子- α 、ionomycin を含む無血清培地で培養した際に成熟の DC に分化誘導させることができることが報告されている[14]。一方で血清入りの条件下で分化誘導すると未成熟な DC には分化させられるものの、成熟な DC に分化させることはできない[14]。さらに THP-1 細胞は通常の培養条件下では、phorbol-12-myristate-13-acetate および 1,25-dihydroxyvitamin D3 などの刺激に応答して、マクロファージに容易に分化するが、DC には分化しない[15]。そのため本実験のような通常の培養条件下では、DC よりもマクロファ

ージに分化する傾向があるため、DC に比べ抗原提示能が弱いために HCA の抗原性を検出できなかつた可能性が考えられる。一方で、DC2.4 細胞は成熟 DC であり DC としての性質である抗原提示能を強く示す[16]。その結果、DC2.4 細胞皮膚感作性試験では HCA の抗原性を検出できた可能性が考えられる。

なぜそもそも抗原提示能が乏しい THP-1 細胞が用いられているかの理由については、h-CLAT のガイドラインでは述べられておらず、ヒトに近い条件下で実験を行うためにヒト由来の細胞を使用したことが推測される。また、開発段階でいくつかの DC 様の細胞株で比較しており、最も LLNA との一致率が高い細胞であるという理由から THP-1 細胞が注目されており[17]、単球由来細胞という点が使用の根拠になっているわけではないと推察される。こうした背景からも、抗原性評価というエンドポイントに対してプロフェッショナルな抗原提示細胞である DC2.4 細胞を使用することは最も合理的だと考えられる。

ガイドラインでは、h-CLAT 単独で感作性予測を行うことは不十分であり、複数の試験を組み合わせるべきだとされている。また、h-CLAT では、感作強度の低い化合物や HCA のような脂溶性の高い化合物ほど偽陰性の確率が高くなることもガイドラインで示されている。DC2.4 細胞皮膚感作性試験は、脂溶性の高い化合物についても評価できる可能性が示されたことから、DC2.4 細胞皮膚感作性試験を用いることで、h-CLAT において偽陰性と判定され

る化合物を見逃さずに検出できる可能性が考えられる。DC2.4 細胞皮膚感作性試験は h-CLAT とは細胞株が異なるのみであり、全く別な方法を導入する場合に比べコストや実験時間も最小限に抑えることが可能であり、導入が容易であることが予測されることから、実現性の面においても有用だと考えられる。

第 2 章 ブラジル産グリーンプロポリス (BGP) を用いた DC2.4 細胞皮膚感 作性試験の有用性評価

第 1 節 緒言

第 1 章において有用性を示した DC2.4 細胞皮膚感作性試験は、h-CLAT では検出できない HCA を検出することができた。このことから DC2.4 細胞を使用することで脂溶性物質を検出できる可能性が考えられる。そこで、第 2 章では感作性の有無が明らかとなっていない脂溶性混合物であるブラジル産グリーンプロポリス (BGP) の感作性評価を試みると同時に、BGP を用いて DC2.4 細胞皮膚感作性試験の脂溶性物質評価における有用性を検討した。

プロポリスは、ミツバチが唾液と植物を原料にして作る樹脂製の脂溶性混合物であり、抗菌、抗炎症、肝保護作用など有益な生理活性を有することが報告されている[18-24]。その一方でプロポリスは以前から皮膚感作性の可能性が疑われてきた[25, 26]。これまでにヨーロッパタイプのプロポリスでは皮膚感作性を有することがモルモットを使用した実験から明らかとなっている[26]。さらに感作性の原因成分も同定されており、混合物 1,1-dimethylallyl caffeic acid ester (LB-1) とその主要な構成成分である 3-methyl-2-butyl caffeate、phenylethyl caffeate などのカフェ酸エステル類が強い感作性を有するとして報告されている[27, 28]。一方で BGP はその品質の高さから近年世界中で使用頻度が高くなっており、流通

量が増加している[29]。BGPもヨーロッパタイプのプロポリスと同様に感作性が疑われるものの、科学的に確立された試験法による評価は行われておらず、実際にBGPが皮膚感作性を有するかどうかは明らかとなっていない。それにも関わらず現在皮膚に塗布する用途で使用される際には、科学的根拠のない含有量1-2%で使用されている[30]。また、BGPは桂皮酸誘導体を主成分とし、ヨーロッパタイプのプロポリスにおける感作性の原因成分であるカフェ酸エステル類は含まれていない。そこで本検討では、高度な脂溶性物質であり皮膚感作性の有無が不明であるBGPの感作性を、DC2.4細胞皮膚感作性試験により評価することで、BGPの感作性の有無を明らかにするとともに、脂溶性物質評価におけるDC2.4細胞皮膚感作性試験の有用性を検証した。

第 2 節 THP-1 細胞および DC2.4 細胞を用いた BGP の抗原性評価

h-CLAT のガイドラインでは被験物質を試験する前に、実験施設ごとに陽性対照物質を用いた信頼性評価を行うことが推奨されていることから、まず初めに h-CLAT で推奨陽性対照物質とされている DNCB の感作性を評価した。DNCB 刺激による THP-1 細胞の用量設定試験を、ガイドラインに従い 2 回行った結果 1 回目の CV75 は 4.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 6A)、2 回目の CV75 は 1.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 6B) となり、平均 2.86 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された。h-CLAT ガイドラインでは、DNCB の CV75 の基準範囲は 2.00–12.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とされており、その中央値は 7.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。そこで、2.86 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 7.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 2 つの値の平均値を算出し、4.93 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、これを最終的な CV75 と定義した。この CV75 をもとに最大用量を 5.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と設定し、ガイドラインに従い公比 1.2 で 8 つの投与量 0.89、1.76、2.11、2.53、3.03、3.65、4.38、5.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を設定した。これらの用量で刺激した際の、CD54 および CD86 の発現量測定を 2 回行った(Figure 6C–F)。1 回目の試験では、式 2 (実験材料および方法 1-4 を参照)から CD54 と CD86 の RFI の最高値は、それぞれ 661.4%と 240.0%で、それぞれの陽性判定基準である 200%と 150%を超え(Figure 6C, D の破線)、2 回目も同様の結果となった。h-CLAT では、CD54 または CD86 の RFI が、細胞生存率が 50%以上となるいずれかの用量において発現基準を超えた際に陽性と判定される。さらに少なくとも 2 回の実験におい

て同様の結果が得られた際に感作性の判定が可能であることから、上記 2 回の試験結果から DNCB の抗原性は陽性であると判定され、陽性対照物質を正しく評価できたことから、試験が適切に行われたことを確認した。

そこで次に h-CLAT を用いて BGP の感作性評価を行った。用量設定試験では、BGP の CV75 値は 1 回目の試験で 34.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 7A)、2 回目の試験で 53.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 7B) と算出され、2 回の平均値は 44.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。CV75 (44.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$) から、最高用量としてガイドラインで定められた $1.2 \times \text{CV75}$ 値を算出すると 53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となった。今回使用した BGP は 55 % (w/v) エタノール抽出物であり、細胞実験に用いる際のエタノールの終濃度を 0.1% とした場合、BGP の調製可能な最大用量は 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となる。これは最高用量としてガイドラインで定められた $1.2 \times \text{CV75}$ (53 $\mu\text{g}/\text{mL}$) とおおよそ等しい値となった。そこで、BGP 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最大用量とし、そこからガイドラインに従い公比 1.2 で振った 15.3、18.4、22.1、26.5、31.8、38.2、45.8、55.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 8 濃度を被験物質用量として設定した。そこで本試験として溶媒及び各濃度の BGP で刺激したところ 1 回目の試験 (Figure 8A, B)、2 回目の試験 (Figure 8C, D) とともに、CD54 および CD86 の発現量に基準を上回る変化は見られなかった。以上より、h-CLAT では、BGP の抗原性は陰性と判定された。

次に DC2.4 細胞を用いて h-CLAT と同様に BGP の抗原性を評価した。THP-1 細胞と同様に 55.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最大用量として各濃度の BGP で刺激したところ、CD54 の発現量は BGP 刺激によって明らかな変化は見られなかった(Figure 9A) 一方で、CD86 の発現量は用量依存的に増加した。さらに、CD86 の RFI 値が最も高かったのは 156.73% (BGP 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 刺激時) で、h-CLAT で定められる陽性判定基準である 150% を超えていた(Figure 9B)。以上の結果から DC2.4 細胞皮膚感作性試験では、BGP の抗原性は陽性と判定された。

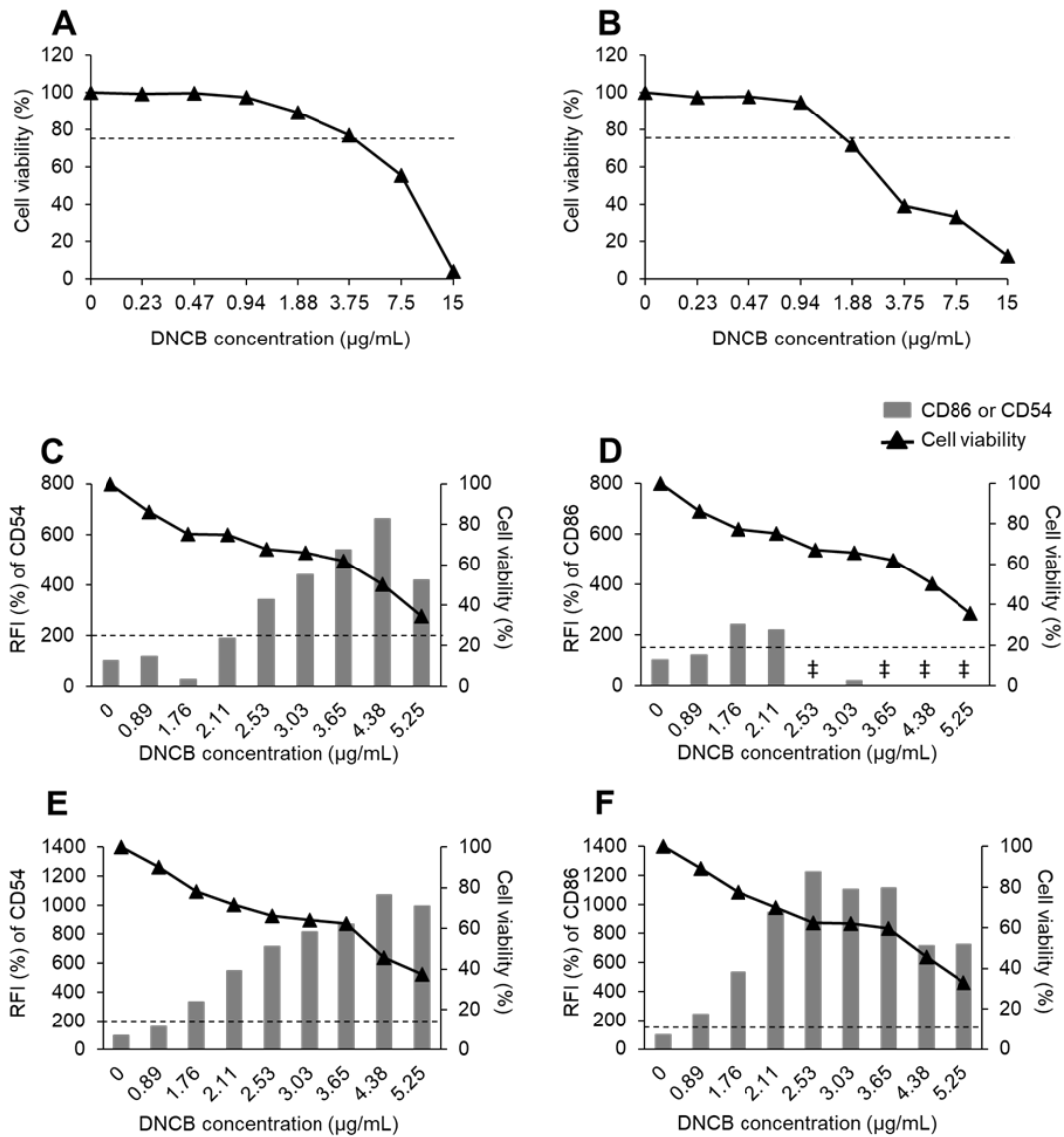


Figure 6. Cell viability and expression of CD54 and CD86 on THP-1 cells treated with DNCB. Cells were treated with DNCB at various concentrations for 24 h. (A, B) Dose-finding assays were performed by staining dead cells with 7-amino-actinomycin D and detecting them by flow cytometry. First experiment (A) and second experiment (B) were conducted independently, and data at each concentration were obtained from a single culture. Dashed lines indicate 75% cell viability. (C–F) The expression of CD54 (C, E) and CD86 (D, F) was measured by flow cytometry, and the relative fluorescence intensity (RFI) values were calculated from the data. First experiment (C, D) and second experiment (E, F) were conducted independently, and data at each concentration were obtained from a single culture. Dashed lines indicate RFI values of 200% (CD54) or 150% (CD86). †: RFI < 0.

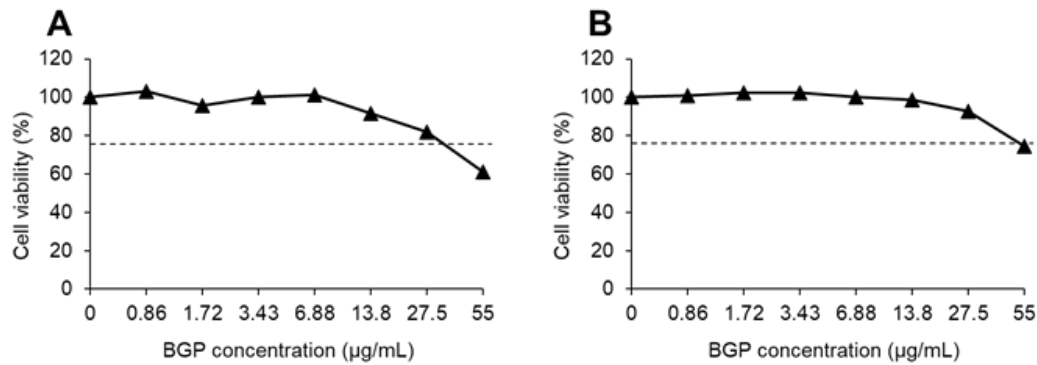


Figure 7. Viability of THP-1 cells treated with Brazilian green propolis (BGP). First experiment (A) and second experiment (B) were conducted independently, and data at each concentration were obtained from a single culture. Dashed lines indicate 75% cell viability.

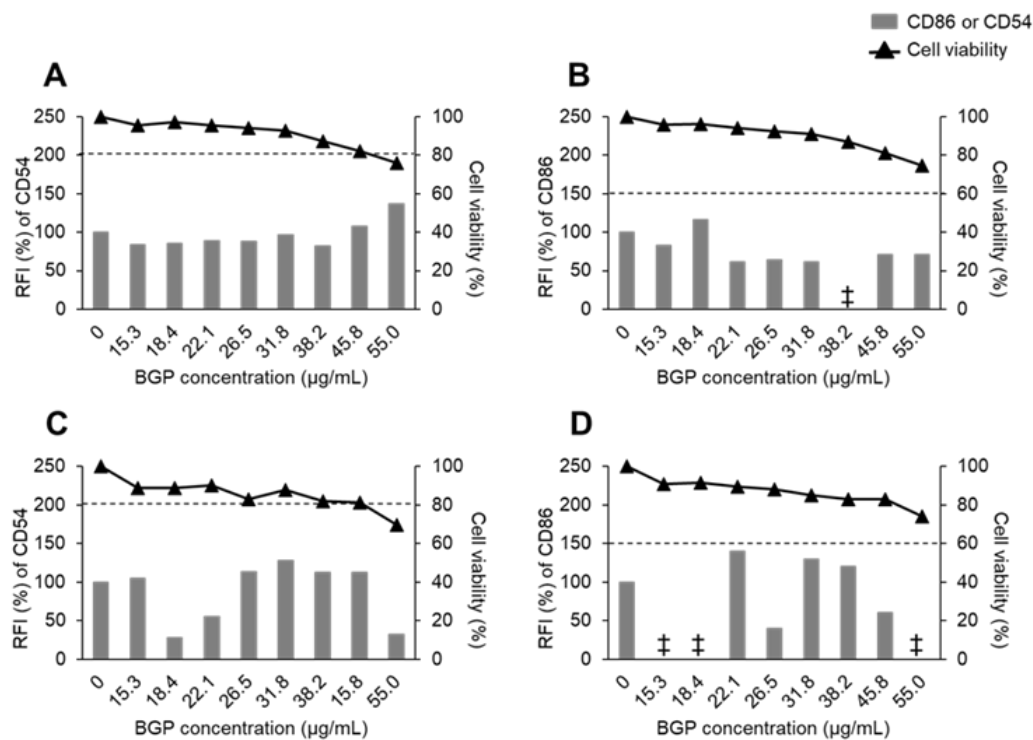


Figure 8. Viability of and expression of CD54 and CD86 on the cell surface of THP-1 cells treated with Brazilian green propolis (BGP). The expression of CD54 (A, C) and CD86 (B, D) was measured by flow cytometry, and the relative fluorescence intensity (RFI) values were calculated from the data. First experiment (A, B) and second experiment (C, D) were conducted independently, and data at each concentration were obtained from a single culture. Dashed lines indicate RFI values of 200% (CD54) or 150% (CD86). ‡: RFI < 0.

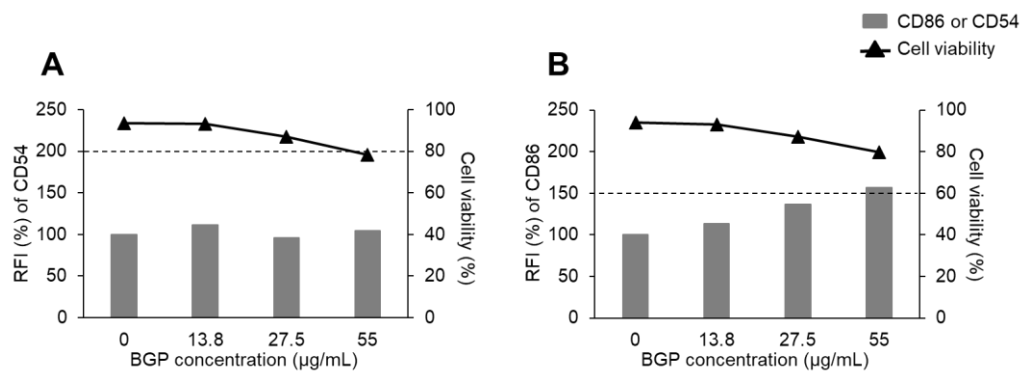


Figure 9. Viability of and expression of CD54 and CD86 on the cell surface of DC2.4 cells treated with Brazilian green propolis (BGP). The expression of CD54 (A) and CD86 (B) was measured by flow cytometry, and the relative fluorescence intensity (RFI) values were calculated. The data at each concentration were obtained from a single culture. Dashed lines indicate RFI values of 200% (CD54) or 150% (CD86).

第3節 LLNAによるBGPの皮膚感作性評価

第2節においてBGPの抗原性は、THP-1細胞を用いた既存のh-CLATでは陰性であった一方で、DC2.4細胞皮膚感作性試験の結果では陽性であり、異なる結果が得られた。このことから従来のh-CLATでは検出できなかったBGPを、DC2.4細胞皮膚感作性試験では検出できる可能性が考えられた。そこで、確定試験であるLLNAを用いてBGPの感作性を評価することで、DC2.4細胞皮膚感作性試験における判定がLLNAと一致するか否かを検証した。

動物実験の中でもLLNAは、化学物質のアレルギー誘発能を推定する際の「ゴールドスタンダード法」と考えられており、皮膚感作性を評価するための第一選択の方法となっている[31]。LLNAでは、試験が適切に実施されていることを確認するために、実験施設ごとに陽性対照物質を用いた感作性評価が推奨されている。また、マウスの系統としてCBA/CaまたはCBA/Jマウスの若齢雌が最も推奨されているが、LLNAに系統や性別による有意差がないことを示す十分なデータがあれば、他の系統や雄を使用することも可能であるとされている。そこでBGPを評価する前に、雌性BALB/cマウスを用いてLLNAの陽性対照物質であるHCAを評価することで、BALB/cマウスを使用することの妥当性と実験の信頼性を確認した。HCAを評価した結果、溶媒または各濃度のHCAに曝露後のマウスの流入領域リンパ節細胞へのthymidine, [methyl-3H] (^3H -チミジン)の

取り込み量(DPM 値)は 357.11(溶媒群)から、5.0% (v/v)および 15.0% (v/v)の HCA 処理によりそれぞれ 701.78 および 2030.18 に増加した(Figure 10A)。さらにこのデータから、溶媒群の平均 DPM 値を 1 とした際に各群の DPM 値を比で表した SI 値と呼ばれる刺激指数を算出し、EC3 と呼ばれる SI 値が 3 になる際の用量を算出した(式 3: 実験材料および方法 2-6 を参照)。HCA の SI 値の結果から(Figure 10B)、EC3 値は 8.98%と算出され LLNA ガイドラインの基準値(4.8–9.5%)の範囲内であったことから、当研究室において LLNA が適切に行われていたことを確認した。

次に同様の方法により、LLNA による BGP の感作性を評価した。2 回の実験の結果 15.0% (w/v)の BGP を 3 日連続で投与したマウスは、溶媒のみを投与したマウスに比べ、5 日目において耳介周辺の明らかな炎症が観察された(Figure 11)。1 回目の LLNA の結果、流入領域リンパ節である耳介リンパ節における³H]-チミジン取り込み量を示す DPM 値は用量依存的に上昇しており、平均 DPM 値は 328.7(溶媒群)から、1.88%および 15.0% (w/v)の BGP 投与により、それぞれ 1377.2 および 4685.4 に上昇した(Table 2 Exp. 1)。この結果から得られた各個体の DPM 値を SI 値に換算したところ(Figure 12A)、予想に反し最小用量である 1.88%では SI 値が 3 を超えてしまい、EC3 値を算出することができなかった。そこで EC3 値を算出することで再現性を確認するために、より低用量の 0.94% (w/v) BGP 投

与群を追加して2回目のLLNAを行った。1回目の実験と同様に、15% (w/v)BGP投与群の耳介リンパ節における平均DPM値は、溶媒群よりも著しく高かった (Table 2 Exp. 2)。0.94% (w/v) BGP群の平均DPM値は422.8で、溶媒を投与した対照群の329.8に近い値となった (Table 2 Exp. 2)。2回の結果を総合的に判断するために、Table 2 Exp. 1とTable 2 Exp. 2のデータを総合して両実験における各個体のSI値を算出することにより (Figure 12C)、BGPの感作性発現域を求めた。用量反応曲線としてプロットした平均データ (Figure 12C)をもとに式3 (実験材料および方法2-6を参照)から、EC3値を算出したところ1.70% (w/v)となった。この結果から、BGPは1.70% (w/v)以上の用量で感作性を有することが明らかとなった。さらにこの結果から、3-1で得られたh-CLATでBGPが陰性となった結果は偽陰性であったと判断することができ、DC2.4細胞皮膚感作性試験ではBGPを適切に評価できることが明らかとなった。以上よりDC2.4細胞皮膚感作性試験は、脂溶性物質の抗原性評価においても有用である可能性が示された。

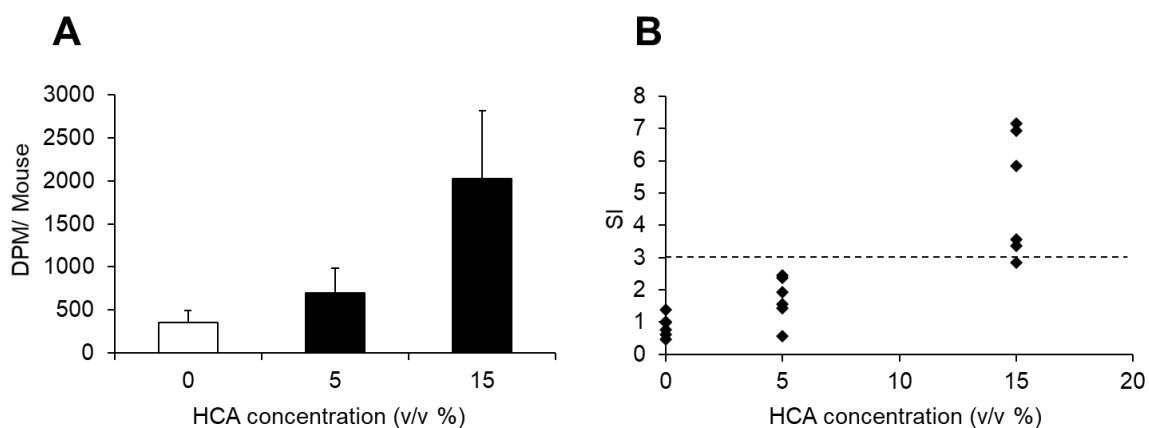


Figure 10. Evaluation of contact sensitization response for HCA by LLNA. Vehicle, 5.0% HCA or 15.0% HCA (n = 6 per group) was applied to both ears of mice for 3 consecutive days. After a 2-day untreated period, [³H]-thymidine was administered by tail vein and the proliferation of lymphocyte cells was evaluated. **(A)** Incorporation of [³H]-thymidine into auricular lymph node cells was expressed as the mean DPM ± 1SD. **(B)** Stimulation index (SI) values were calculated from DPM values. Dashed lines indicate SI = 3.

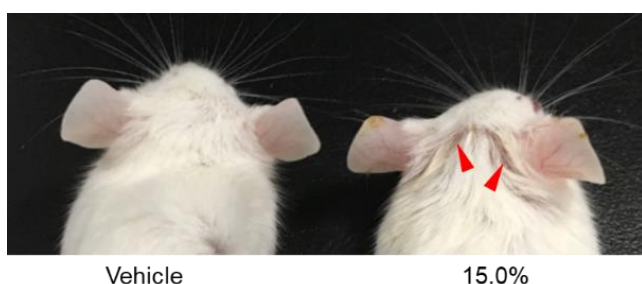


Figure 11. Ear inflammation induced by Brazilian green propolis (BGP). Vehicle or 15.0% (w/v) BGP was applied to the back of the ears of mice for 3 consecutive days for LLNA. In LLNA, all mice treated with 15.0% (w/v) BGP showed obvious ear inflammation at day 5 from the first exposure. The photos show the typical ears of control mouse (Vehicle; left photo) and inflamed mouse (15.0% BGP; right photo), respectively. Red arrowheads indicate the inflammatory response.

Table 2. Detailed data of local lymph node assay for Brazilian green propolis (BGP).

Experiment	Concentration % (w/v)	DPM ^a (Mean or Mean \pm 1 S.D.)	Number of Animals Used
Exp. 1	0.00	328.7 \pm 276.5	4
	1.88	1377.2 \pm 939.8	3
	3.75	1587.2 \pm 467.5	5
	7.50	2208.0 \pm 983.4	4
	15.00	4685.4 \pm 2574.1	4
Exp. 2	0.00	329.8 \pm 55.3	4
	0.94	422.8 \pm 113.1	5
	1.88	720.9	2
	3.75	501.3 \pm 143.7	4
	7.50	983.8	2
	15.00	2644.9	2

^aDPM, disintegrations per minute.

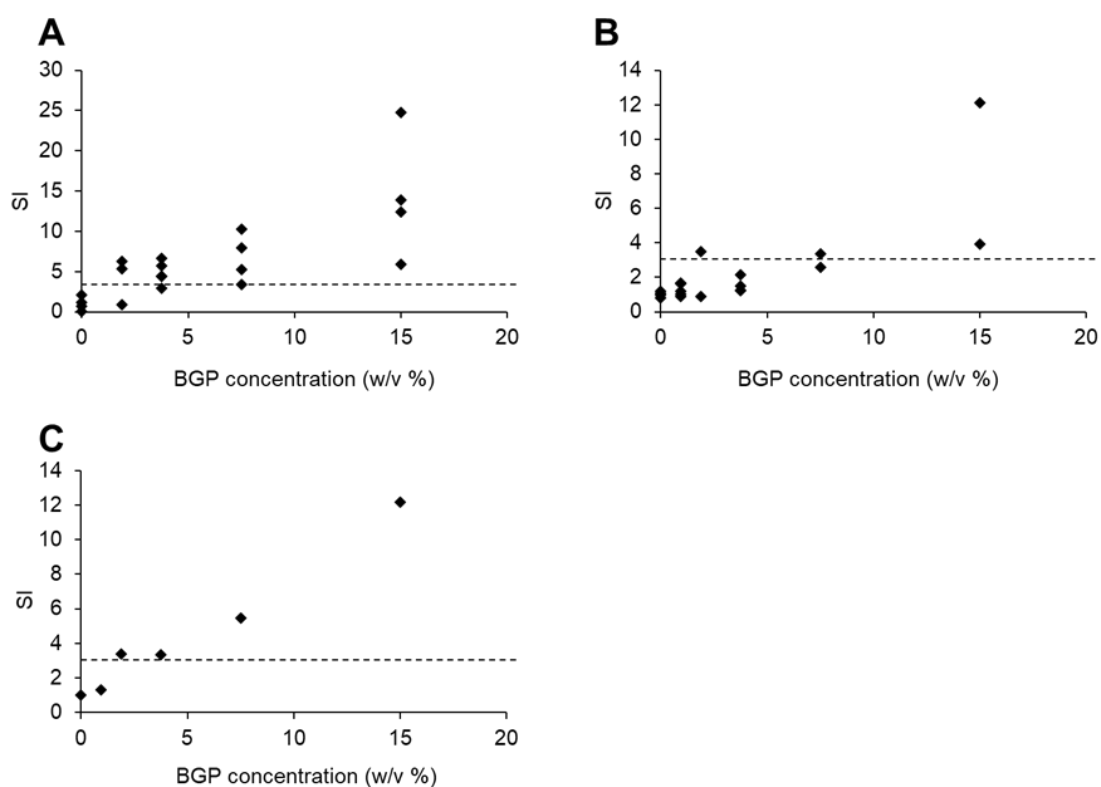


Figure 12. Evaluation of contact sensitization response to Brazilian green propolis (BGP) by LLNA. The stimulation index (SI) values of each mouse were calculated from DPM values (incorporation of [³H]-thymidine in auricular lymph node cells). **(A)** First experiment (n = 3–5) calculated from Table 2 Exp 1; **(B)** second experiment (n = 2–5) calculated from Table 2 Exp 2. **(C)** Mean SI values calculated from the data shown in **(A)** and **(B)**. Dashed lines indicate SI = 3.

第4節 考察

本章では、第1章で有用性を示した DC2.4 細胞皮膚感作性試験および h-CLAT と LLNA の 2 つのガイドライン試験を用いて、感作性が疑われている脂溶性混合物である BGP の皮膚感作性を評価した。その結果 BGP は h-CLAT では陰性と判定されたが、LLNA および DC2.4 細胞皮膚感作性試験では陽性と判定された。皮膚感作の確定試験である LLNA で陽性となったことから、最終的に BGP は皮膚感作性があると判断され、h-CLAT の結果は偽陰性であった一方で、DC2.4 細胞皮膚感作性試験は BGP の抗原性を検出できたと判断された。上記より DC2.4 細胞皮膚感作性試験は THP-1 細胞を用いた試験よりも LLNA に近い結果が得られることが示唆された。さらに DC2.4 細胞皮膚感作性試験では BGP や第1章で示した HCA のような脂溶性の高い物質を検出できたことから、脂溶性物質の抗原性評価に対しても利用できる可能性が明らかとなった。

また本検討から、これまでに皮膚感作性の有無が不明だった BGP が感作性を有することも新たに明らかにした。現在までにヨーロッパ産プロポリスの皮膚感作性については、LLNA と同程度の信頼性を有するモルモットモキシマイゼーション試験[26]や臨床パッチテスト[25]で検出されており、主要な皮膚感作物質が特定されている。LB-1 は、ヨーロッパ産プロポリスで最初に同定された感作性物質である[27,28]。プロポリスの成分の中でも、benzyl caffeate や 3-methyl-

2-butyl caffeate などのカフェ酸類の一部は強い皮膚感作性物質であり、桂皮酸や安息香酸は弱い感作性物質である[28]。しかし、kaempferol などのフラボノイドによる皮膚感作は検出されていない[28]。今回使用した BGP は、主に桂皮酸誘導体とフラボノイドから構成されていることから(Table 4)、BGP の皮膚感作性は桂皮酸誘導体に由来するものが原因である可能性が推察される。BGP は化粧品など皮膚に塗布する様々な製品に使用されているが、その安全な用量域はまだ科学的に確認されておらず、経験的に安全とされる 1-2%という含有量で使用されてきた[30]。本検討では、感作性が陽性となる SI 値 3 を与える用量である EC3 値を算出したところ 1.7% (w/v)と算出されたことから、BGP が含有量 1.70% (w/v)以上で感作性を有する可能性が明らかとなった。さらに EC3 はその値から被験物質の感作性強度を、極強度($0\% < EC3 < 0.1\%$)、強度($0.1\% \leq EC3 < 1.0\%$)、中等度($1.0\% \leq EC3 < 10\%$)、軽度($10\% \leq EC3 \leq 100\%$)と分類することができる[32] (実験材料および方法 2-6 を参照)。上記の分類から、BGP は中等度感作性物質に該当する可能性が明らかとなった。また本結果より、これまで経験的に用いられてきた 1-2%という含有量は、安全に使用できる可能性が示された。

以上より本章では、脂溶性混合物である BGP の感作性を DC2.4 細胞皮膚感作性試験により検出可能であることを明らかにし、第 1 章で示した代表的なハブ

テンの抗原性検出に加え、脂溶性物質の抗原性検出においても DC2.4 細胞皮膚感作性試験が有用であることが示された。

第3章 MUP22 を介した新規抗原性獲得機構の解明

第1節 緒言

本章では既知の抗原性獲得機構に着目し、MUP22 を介した新規抗原性獲得機構の解明を行った。ハプテンは多くの場合、単独では抗体反応を誘導しないが、生体内で免疫原性をもつキャリアーとなるタンパク質(キャリアータンパク質)と結合することで、初めて抗原性を獲得する。この際ハプテンは、タンパク質のペプチド断片であるリジンまたはシステイン残基を介した共有結合により強固に結合する[33]。動物実験代替法として構築された DPRA は、リジンまたはシステイン残基を介した共有結合を検出することで、ハプテンの抗原性を評価する試験法である。しかし DPRA では、確定試験である LLNA の代替法として位置づけられているにもかかわらず LLNA の推奨陽性対照物質である HCA の抗原性を検出できないことが大きな問題となっている[34,35]。さらに DPRA と LLNA の結果とを比較した場合、DPRA による皮膚感作性の正確度は 80% (N = 157) であることがガイドライン(OECD TG 442C)に記載されており、DPRA では 20% の被験物質が正しく評価できていないのが現状である。これはハプテンの抗原性を検出するためには、ハプテンとキャリアータンパク質との共有結合を検出するのみでは不十分であることを示している。すなわちハプテンは、キャリア

タンパク質のリジンまたはシステイン残基を介した共有結合とは異なる結合様式を介して、抗原性を獲得する可能性が考えられる。

共有結合のような強い結合とは異なる結合様式として、ハプテンと弱く結合するタンパク質が存在し、抗原性獲得に関与している可能性を考えた。リポカリンファミリー分子は、構造上の分類であり 8 つのストランドからなる籠状の β バレル構造をとるタンパク質ファミリーである。 β バレル構造内部に疎水性結合部位をもつことから、内因性のリガンドや外来物質と結合し、化学物質の輸送に関わるキャリアーとしての機能を有することが報告されている[36]。また、リポカリン分子の一つである Major urinary proteins (MUPs)は、マウスの全身に発現しているタンパク質で、フェロモンのキャリアーとして機能することが報告されている[37]。さらに *Mups* は現在までに 1-22 までサブタイプが同定されており[38]、そのうち *Mup1*、2, 7, 8, 9 などは研究が進められているものの[37]、22 番目のサブタイプである *Mup22* は近年新たに同定された[38]ものであり、その機能は全く分かっていない。また MUPs はラットの毒性異物排除に関わるタンパク質である $\alpha 2u$ -globulin のオルソログであることが知られていることから[39]、MUPs が $\alpha 2u$ -globulin と同様に毒性異物排除にも関わる可能性が考えられる。以上のことから本章では *Mup22* に着目し、MUP22 タンパク質がハプテンと結合して輸送するキャリアータンパク質として機能することで、アレルギー性接触皮

膚炎における抗原性獲得に関与している可能性を考えた。本章では、MUP22 タンパク質が抗原性獲得段階であるハプテンとの結合性を示すかどうかを検証した。

第2節 MUP22 とハプテンの結合性評価

まずハプテンと MUP22 タンパク質が結合するかどうかを評価するために、Epp らが以前に報告した式[40]を用いて、N-Phenyl-1-naphthylamine (NPN)競合阻害実験を行った(Figure 13A, 式4:実験材料および方法 3-6 を参照)。NPN は疎水場に入るとピークがシフトし、395 nm 付近に吸収極大を持つ。従って MUP22 タンパク質と NPN を混合すると、NPN は MUP22 タンパク質の疎水性ポケットに入ることで蛍光を発生し、競合物が MUP22 タンパク質と結合して NPN と MUP22 タンパク質との結合を阻害することで蛍光の消失が観察される。この蛍光の消失を指標にしてハプテンと MUP22 タンパク質との結合性を評価した。NPN 競合実験を結合性評価に用いる前に、既知の MUPs リガンドである 2-methoxy-3-isobutylpyrazine (IBMP)および 2-methoxy-3-isopropylpyrazine (IPMP)[41, 42]を用いて、実験系が正しく再現されるかどうかを確認した。MUP22 タンパク質と NPN の混合物に IBMP または IPMP を添加すると、NPN の強度は徐々に低下し、この際の阻害定数(K_i)はそれぞれ 1.51 と 7.48 であった(Figure 13B, C)。 K_i 値は、値が小さいほど結合が強いことを示しており、この結果は MUP22 タンパク質への結合の強さは IBMP の方が IPMP よりも強いことを示している。これは既に報告されている MUPs との結果と一致しており[43]、MUP22 タンパク質を使用してもこの実験系を再現できることを確認した。

次に、感作強度の異なる9種類のハプテンのMUP22タンパク質への結合性を評価した。その結果、極強度感作性物質であるDNCBとFluorescein 5-Isothiocyanate isomer I (FITC)、中等度感作性物質であるMBT、軽度感作性物質であるHCAとCitralをMUP22タンパク質に添加した際には、NPNの蛍光強度が低下したことから、これら5つのハプテンがMUP22タンパク質に結合していることが明らかとなった(Figure 14A-E)。また、5つのハプテンDNCB、FITC、MBT、HCA、CitralとMUP22タンパク質との K_i 値はそれぞれ41.25、16.62、0.58、2.12、65.56であった(Figure 14A-E)。一方で残りの4つのハプテンである極強度感作性物質のBenzo (a) pyrene (BaP)、強度感作性物質のBenzoyl peroxide (BPO)とPhthalic Anhydride (PA)、軽度感作性物質のCinnamyl alcoholを添加した際には、NPNの蛍光強度は変化しなかったことから、これらのハプテンはMUP22タンパク質に結合しないことが示唆された(Figure 14F-I)。以上の結果から、MUP22タンパク質はいくつかのハプテンと結合するが、すべてのハプテンと結合するわけではないことが明らかとなった。

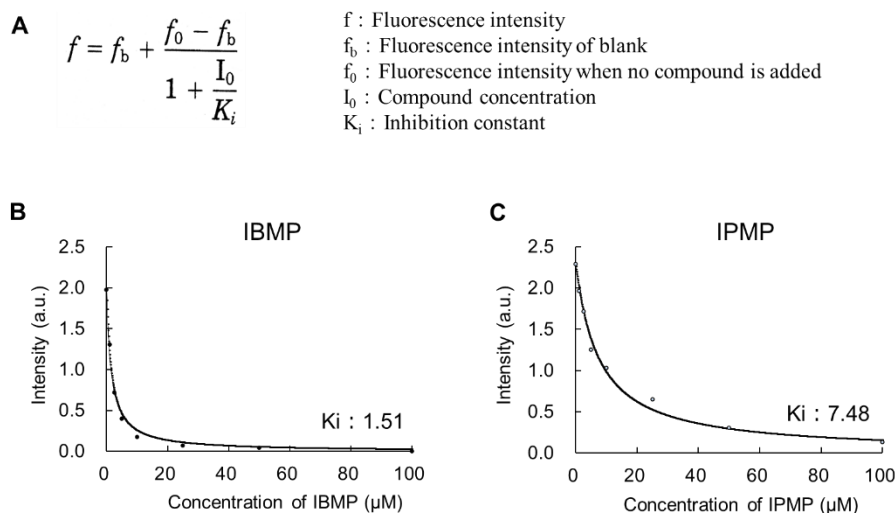


Figure 13. Evaluation of the binding of MUPs ligands to MUP22 by N-Phenyl-1-naphthylamine (NPN) competition assay. **(A)** The curvilinear approximation equation for calculating the K_i values in competitive inhibition experiments using **(A)** non fluorescent substances reported by Epps, D.E. *et al.* **(B and C)** The peak shift of fluorescence by NPN before and after the test substance binds to MUP22. 2-methoxy-3-isobutylpyrazine (IBMP) and 2-methoxy-3-isopropylpyrazine (IPMP) which are known ligands of MUPs, added to 50 mM HEPES pH7.5, with a final concentration of 1.0 μM for the NPN solution and 12 $\mu\text{g/mL}$ for the TF-MUP22 protein. The fluorescence spectrums of samples were measured by a spectrophotometer. The fluorescence intensity at a wavelength of 395 nm was plotted and the curve was approximated by the equation **(A)** to obtain the K_i values of MUP22 and various compounds. Equation **(A)** was reported by Epps, D. E., et al., 1995. *Anal Biochem.* 227(2),342-50.

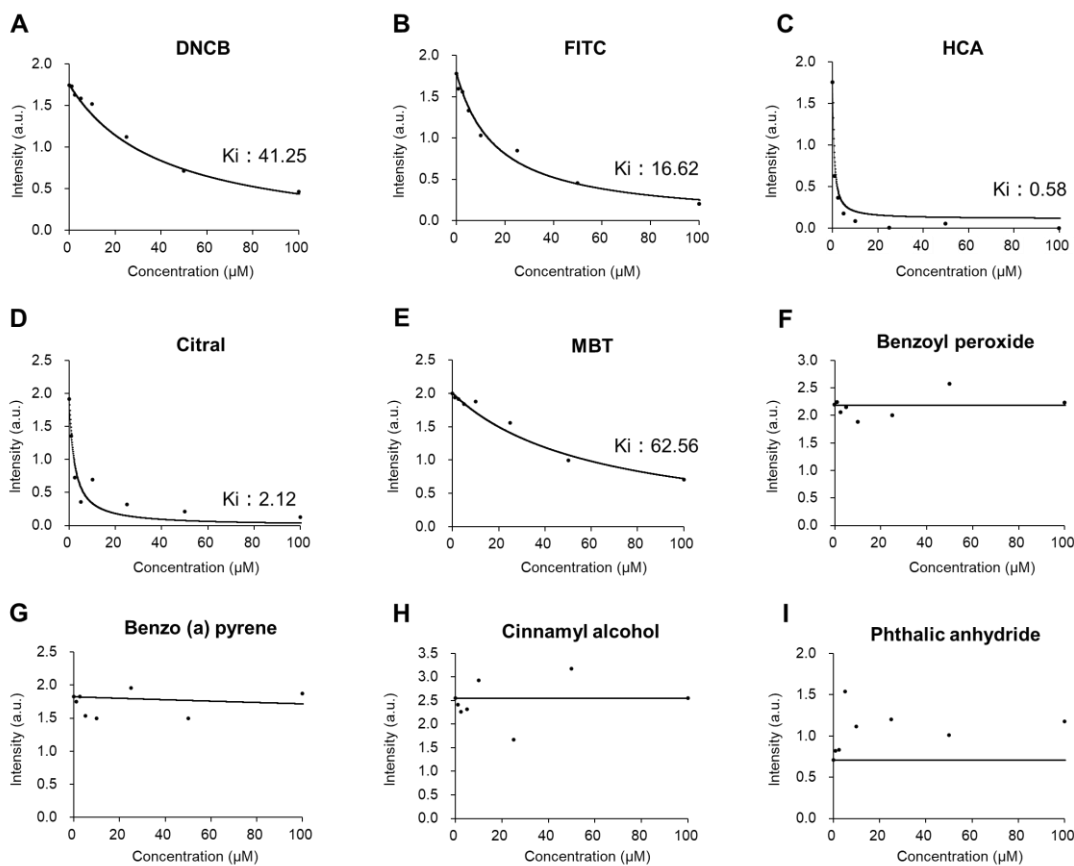


Figure 14. Evaluation of the binding of haptens to MUP22 by N-Phenyl-1-naphthylamine (NPN) competition assay. Haptens were added to 50 mM HEPES pH7.5, with a final concentration of 1.0 µM for the NPN solution and 12 µg/mL for the TF-MUP22 protein. The fluorescence spectrums of samples were measured by a spectrophotometer. The fluorescence intensity at a wavelength of 395 nm was plotted and the curve was approximated by the equation shown in Figure 13A to obtain the K_i values of MUP22 and various haptens.

第3節 *Mup22*-Tg マウスの性状解析

以降の実験では、生体内におけるアレルギー性接触皮膚炎誘導に対する *Mup22* の生理機能を解明するため、マウスを用いた解析を試みた。本検討では、*Mup22* を高発現するトランスジェニックマウスの作成を試みた。また、*Mups* の主な産生臓器は肝臓ではあるものの[44]、全身で発現することが知られている。そのため本検討においては、プロモーターとして Cytomegalovirus early enhancer/chicken β -actin (CAG) プロモーターを用いて、全身で *Mup22* を高発現するトランスジェニック (*Mup22*-Tg) マウスの作製を試みた。

作成した BALB/c 遺伝子背景の *Mup22*-Tg マウスが表現型として *Mup22* を全身で高発現しているかどうかを、mRNA 発現量を測定することにより確認した。*Mups* は2つのサブカテゴリーに分類されており、グループ1は *Mup3*、*Mup4*、*Mup5*、*Mup6*、*Mup20*、*Mup21* であり、グループ2は *Mup22* を含む上記以外の *Mups* である[38, 45]。グループ2はサブタイプ間の相同性が高く *Mup22* の mRNA を特異的に増幅させることが困難であることから本検討では、*Mup22* を含むグループ2全体の mRNA 発現量を測定することにより、*Mup22*-Tg マウスの遺伝子発現を解析した。*Mup* グループ2の評価対象組織は、以降の実験でハプテン塗布部位としている耳介および、アレルギー性接触皮膚炎発症に関与する免疫系臓器として脾臓リンパ節リンパ球細胞、胸腺リンパ節リンパ球細胞、耳介リン

パ節リンパ球細胞、腸間膜リンパ節リンパ球細胞、腋窩鼠経リンパ節リンパ球細胞とした。また、*Mups* 発現はアンドロゲンによって誘導されるため生殖器（子宮および卵巣）、主要な *Mups* 産生臓器である肝臓、およびその他臓器として腎臓と白色脂肪も評価対象組織とした。その結果、肝臓および白色脂肪における *Mup* グループ 2 mRNA 発現量は、野生型マウスと *Mup22-Tg* マウスで明かな差は見られなかったものの、その他のすべての臓器およびリンパ球細胞においては、野生型マウスに比べ *Mup22-Tg* マウスで顕著に高い結果となった(Figure 15)。以上の結果から、作成した *Mup22-Tg* マウスは、肝臓および白色脂肪を除く臓器において、*Mup22* を含む *Mup* グループ 2 を高発現していることを確認した。

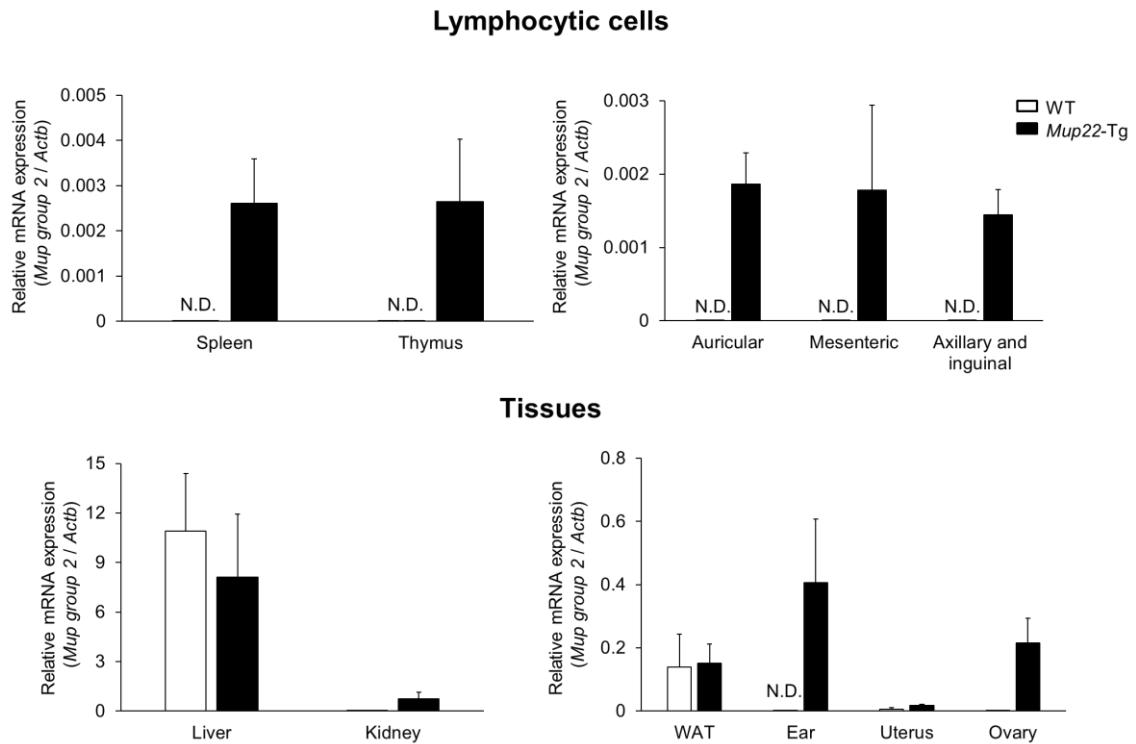


Figure 15. Analysis of *Mup* group 2 mRNA expression levels in *Mup22-Tg* and wild-type (WT) mice. At 8–12 weeks of age, F16–18 generation *Mup22-Tg* and WT littermate female mice were euthanized for removal of liver, kidney, parametrial white adipose tissue (WAT), ovary, ear, uterus, splenocytes, thymocytes, auricular lymph nodes (Auricular), mesenteric lymph nodes (Mesenteric) and axillary and inguinal lymph nodes. *Mup* group 2 mRNA levels of each tissue were analyzed by quantitative real-time RT-PCR. Results were expressed as means \pm 1SD (n = 4–5). N.D.; not detected.

第4節 抗原提示細胞のリンパ節移行に与える *Mup22* 高発現の影響

Mup22 はハプテンとキャリアタンパク質が結合した後の段階にも関与している可能性が考えられる。そこで作成した *Mup22*-Tg を用いて FITC painting assay を行うことにより、*Mup22* が抗原提示細胞の活性化とその後のリンパ節への移行の段階に関与するかどうかを評価した。評価方法として FITC painting assay を行った。FITC は、ハプテンでありかつ蛍光物質でもある。したがって、FITC painting assay では、ハプテンとして皮膚に塗布した FITC の蛍光を追跡することで、FITC を捕捉して活性化し、所属リンパ節へ移行した DC 割合の評価が可能である。*Mup22*-Tg マウスと野生型マウスを用いて、FITC を捕捉して最終的にリンパ節へ移行してきた DC の割合を比較することで、抗原の取り込みとリンパ節への移行段階における *Mup22* の寄与解明を試みた。マウスの両耳に 8.0 mg/mL の FITC を 50 μ L 塗布し、その 6 時間または 18 時間後における、MHCII (抗原提示細胞マーカー) 発現細胞、CD11c (活性化樹状細胞マーカー) 発現細胞、FITC 陽性細胞の割合を測定した。FITC 塗布後 6 時間におけるリンパ節には既に MHCII⁺CD11c⁺FITC⁺細胞が存在したことから、6 時間後には FITC の捕捉による DC の活性化とリンパ節移行が開始していることが明らかとなった。(Figure 16A, C)。さらに MHCII⁺CD11c⁺FITC⁺細胞割合の平均値は、野生型マウスでは 0.44%、*Mup22*-Tg マウスでは 0.70% であり、*Mup22*-Tg マウスの方が野生型マウスに比

べ有意に高いことから、*Mup22* は FITC 塗布 6 時間後において、DC の抗原取り込みと活性化及びその後のリンパ節への移行に関与している可能性が示された。一方で 18 時間後では、MHCII⁺CD11c⁺FITC⁺細胞割合の平均値は、野生型マウスでは 1.69%、*Mup22*-Tg マウスで 1.45%であり、野生型マウスと *Mup22*-Tg マウスで有意な差は認められなかった。このことから *Mup22* は 18 時間後においては DC による抗原取り込みと活性化及びその後のリンパ節への移行に関与しない可能性が示された。これらの結果から、*Mup22* は DC がハプテンを認識して活性化しリンパ節に移行する一連の段階において、比較的早い時期に寄与している可能性が示された。

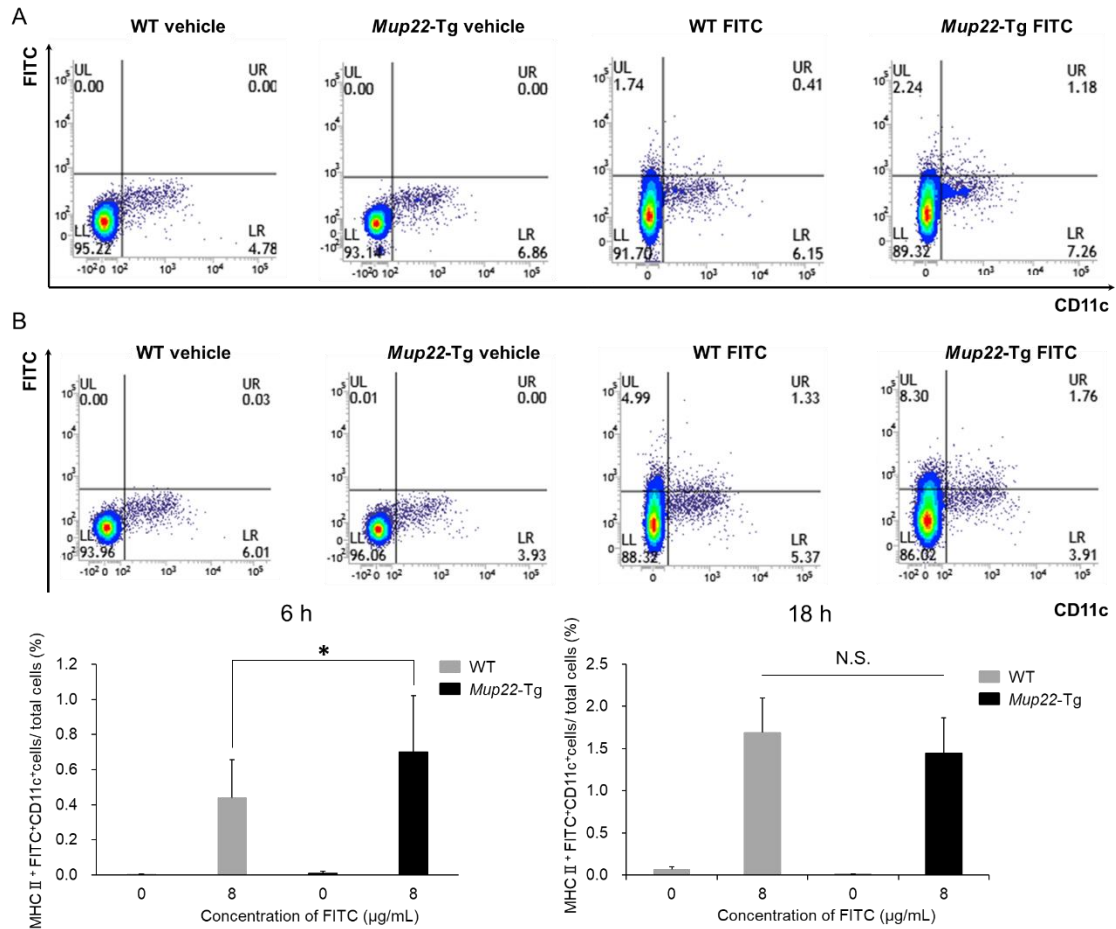


Figure 16. Comparison of the capacities of antigen uptake and migration to lymph nodes between *Mup22-Tg* and wild-type BALB/c mice by FITC Painting Assay. Mice were applied with 25 μ L of FITC or vehicle on both ears, and sacrificed 6 h or 18 h after treatment. The draining auricular lymph nodes cells were stained with APC-labeled anti-MHCII antibodies, PE-labeled anti-CD11c antibodies and the fluorescence of APC, PE, and FITC were analyzed by flowcytometry. (A, B) MHCII⁺ cells were gated from all live cells and then divided into FITC⁺ cells and CD11c⁺ cells. Dot plots images of lymph nodes cells which were collected (A) 6 h or (B) 18 h after FITC treatment. (C, D) The percentage of triple positive cells; APC⁺, FITC⁺ and CD11c⁺ cells, which are corresponding to upper right area of (A) or (B). Results were expressed as the mean \pm 1SD, (n = 7–14), * P < 0.05 (Student's t-test). N.S.; not significant.

第5節 *Mup22* 高発現が皮膚感作感受性に与える影響

次に、最終的な感作成立段階に *Mup22* が関与するかを検討するために、*Mup22*-Tg マウスと野生型マウスを用いて LLNA を行い、皮膚感作の感受性を比較した。LLNA は、OECD TG 429 に準拠して行った。ハプテンとして、軽度感作性に分類される HCA と Cinnamyl alcohol [18]を用いた。ここで HCA は MUP22 タンパク質に結合するハプテンとして、Cinnamyl alcohol は MUP22 タンパク質に結合しないハプテンとして用いた。

まず HCA の結果について、野生型マウスにおける平均 DPM 値は 383.01(溶媒群)から HCA 感作により 853.18 に上昇した。また *Mup22*-Tg マウスにおける平均 DPM 値は 379.58(溶媒群)から HCA 感作により 6653.24 に上昇した(Table 3)。これらの DPM 値の結果を、溶媒群に対して HCA 感作群では何倍増加したかを比で表した SI 値に換算すると、HCA 25% (v/v)感作時の平均 SI 値は、野生型マウスでは 13.84、*Mup22*-Tg マウスでは 18.15 であり、*Mup22*-Tg の方が野生型よりも有意に高い結果となった(Figure 17A)。

一方で、Cinnamyl alcohol の結果について、野生型マウスにおける平均 DPM 値は 652.76 (溶媒群)から Cinnamyl alcohol 感作により 2892.60 に上昇した。また、*Mup22*-Tg マウスにおける平均 DPM 値は 462.38 (溶媒群)から CA 感作により 2114.56 に上昇した(Table 3)。これらを SI 値に換算すると、Cinnamyl alcohol 100%

(w/v)感作時の平均 SI 値は、野生型マウスでは 4.43、*Mup22-Tg* マウスでは 4.57 であり、野生型と *Mup22-Tg* マウスの間で有意な差は認められなかった(Figure 17B)。これらの結果から、MUP22 タンパク質は自身と結合するハプテンに対しては感作感受性を増強する方向にはたらき、結合しないハプテンに対する感作感受性には関与しない可能性が示された。

Table 3. DPM values of LLNA

Hapten's name	Concentration (%)	Mean DPM values \pm S.D.	
		Wild-type	<i>Mup22-Tg</i>
	HCA	0	383.01 \pm 208.67
	25 (v/v)	4853.18 \pm 1968.86	6653.24 \pm 2829.38
Cinnamyl alcohol	0	652.76 \pm 473.13	462.38 \pm 313.62
	100 (w/v)	2892.60 \pm 808.42	2114.56 \pm 353.15

Results were expressed as the mean \pm 1 S.D., (HCA; n = 19–32, Cinnamyl alcohol; n = 4–7).

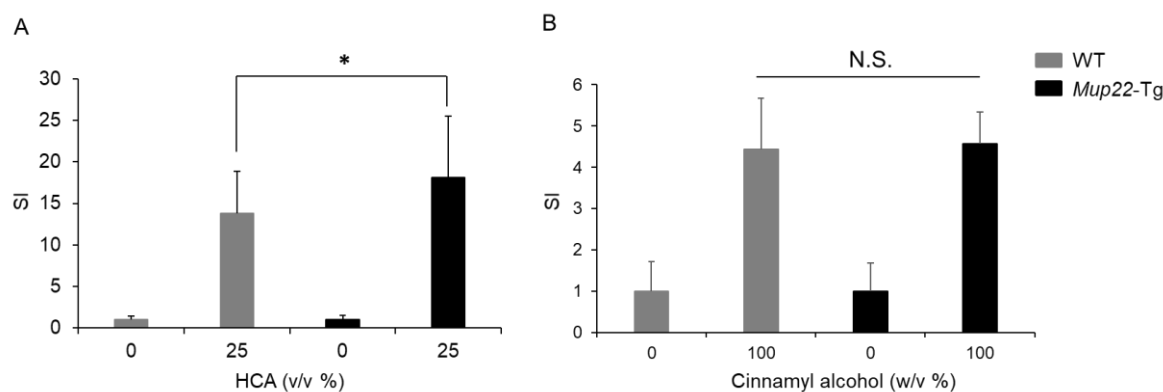


Figure 17. Evaluation of contact sensitization response to HCA and Cinnamyl alcohol by LLNA. Vehicle, 25% (v/v) HCA, and 100% (w/v) Cinnamyl alcohol were applied to the back of the both ears of *Mup22-Tg* or wild-type BALB/c mice for 3 consecutive days for LLNA. On day 5, mice were injected with 20 μ Ci of [3 H]-thymidine through the tail vein. After 5 h, mice were sacrificed and the auricular lymph nodes were excised and precipitated with TCA. Pellets were resuspended in 1 mL of TCA and the incorporation of [3 H]-thymidine was measured by β -scintillation counting. The stimulation index (SI) values of each mouse were calculated from DPM values (incorporation of [3 H]-thymidine in auricular lymph nodes cells). **(A)** Result of HCA treatment (n = 19–32); **(B)** Result of Cinnamyl alcohol treatment (n = 4–7). Results were expressed as means \pm S.D. * P < 0.01 (Tukey's HSD test). N.S.; not significant.

第6節 考察

本章により、MUP22 タンパク質が一部の代表的なハプテンと結合することを明らかとした。またすべてのハプテンと結合するわけではなく、ハプテンの中には結合するものとしらないものが存在することを見出した。さらに K_i 値から、MUP22 タンパク質とハプテンの結合の強さは、既に報告されているハプテン自体の感作性強度には依存しない可能性も示された。例えば、HCA は軽度感作性物質に分類されているが[18]、MUP22 タンパク質に結合した5つのハプテンの中で K_i 値が最も低く、MUP22 タンパク質との結合力が最も強いことが示された。反対に、DNCB は極強度感作性物質に分類されているが[14]、その K_i 値は41.25 と大きいことから、MUP22 タンパク質との結合は比較的弱いことが示された。既存の DPRA ではリジンまたはシステインとハプテンとの共有結合を検出することで感作性を評価するが、疎水性が高い化合物の検出精度が低いことがガイドライン(OECD TG 442C)において報告されている。HCA は確定試験である LLNA の陽性対照物質であり、DPRA では検出できないことが問題となっており、疎水性が高いことが原因だと考えられている[34, 35]。一方で我々は、HCA は MUP22 タンパク質とは強力に結合することを明らかにした。このことから MUP22 タンパク質は疎水性のハプテンに対する結合性評価にも使用できる可能性が示された。MUP22 タンパク質とハプテンとの結合は、MUP22 の β バレル構

造内部の疎水性リガンド結合部位を介して、 β バレル構造内部に入り込む形で結合していることが推測される。疎水性の高い物質の方が結合しやすいことが予測されたが、疎水性の高さと結合の強さは完全には一致していなかった (各ハプテンの疎水性の程度を示すオクタノール/水分配係数 $\text{Log } K_{ow}$ の値は DNCB 2.27、FITC 4.69、HCA 4.82、Citral 3.45、MBT 2.86、BPO 3.43、BaP 6.11、Cinnamyl alcohol 1.84、PA 2.07 であり、一般的に 3.5 以上だと疎水性が高いとされている [13, 46])。このことから、MUP22 タンパク質は独自の結合スペクトルにより一部のハプテンと結合することでキャリアタンパク質として機能する可能性が考えられた。

MUP22 タンパク質がキャリアタンパク質として抗原性の獲得に関与しているならば、感作の感受性に対しても関与していることが考えられる。そこで、MUP22 タンパク質がハプテンと単に結合するだけではなく、結合した後の抗原提示細胞による抗原の取り込みや感作感受性に対しても関与しているかどうかを評価するために、*in vivo* の検討を行った。*In vivo* の検討を行うにあたり全身で *Mup22* を高発現している *Mup22-Tg* マウスを作成した。まず、*Mup22-Tg* マウスにおける *Mup22* を含む *Mup* グループ 2 の mRNA 発現レベルを確認したところ、肝臓と白色脂肪以外の臓器および各種リンパ球細胞などの免疫関連臓器において *Mup* グループ 2 を高発現していたことから、*Mup22-Tg* マウスの作成に成功したことが確認できた。野生型マウスにおける *Mup* グループ 2 は、肝臓白色脂

肪ではもともと多く発現しており、さらに *Mups* 産生臓器である肝臓では大量に発現していることが確認された。そのため、肝臓と白色脂肪で野生型マウスと *Mup22-Tg* マウスで *Mup* グループ 2 の発現量に有意な差は見られなかった原因は、野生型マウスにおけるベースの発現量が高いためだと考えられる。

作成した *Mup22-Tg* マウスを用いて FITC painting assay を行うことにより、抗原の取り込みとリンパ節への移行性を評価した。その結果、NPN 結合実験(Figure 14)で MUP22 タンパク質と結合することを示した FITC が抗原として取り込まれリンパ節へ移行した割合は、野生型マウスに比べ *Mup22-Tg* マウスで高かった。これは MUP22 タンパク質が FITC と結合することで、ハプテン・キャリアータンパク質複合体として抗原提示細胞に認識され、リンパ節への移行を促進した可能性を示唆している。さらに FITC 塗布後 6 時間では *Mup22-Tg* マウスの方が野生型マウスに比べ有意に移行割合が高かった一方で、18 時間後においては両マウス間で移行性に差は認められなかった。この結果から *Mup22* は DC がハプテンを認識して活性化しリンパ節に移行する一連の段階において、比較的早い時期にのみ寄与している可能性が示された。

続いて *Mup22* が感作感受性に与える影響を評価するために LLNA を行ったところ、MUP22 タンパク質と結合するハプテン HCA を塗布した際には感作感受性は *Mup22-Tg* マウスの方が野生型マウスよりも有意に高かった。その一方で、

MUP22 タンパク質と結合しないハプテン Cinnamyl alcohol を用いた際には、感作感受性は *Mup22-Tg* マウスと野生型マウスで差が認められなかった。この結果は、MUP22 タンパク質がキャリアタンパク質として結合したハプテンを運ぶことで、感作感受性に影響を与えていることを強く示唆する結果だと考えられる。以上の結果から、MUP22 タンパク質は単に結合するだけではなく、その後の抗原提示細胞の活性化からリンパ節移行と、最終的な皮膚感作感受性にも関与し、キャリアタンパク質として機能する可能性が明らかとなった。

本研究結果から MUP22 タンパク質は一部ハプテンとの結合性を有することが明らかとなり、NPN 結合試験のような MUP22 タンパク質と化学物質の結合性検出系は新規皮膚感作性代替法として利用できる可能性が示唆された。ガイドラインでは、DPRA 単独で感作性予測を行うことは不十分であり、試験法を組み合わせて総合的に判断するべきだとされている。また、DPRA では、金属を検出できないことや HCA のような疎水性の高い物質で偽陰性になる確率が高いことが報告されている[47]。一方で今回着目した MUP22 タンパク質は、既存の DPRA では検出しづらい高疎水性の化合物とも結合性を示した。さらに当研究室では MUP22 タンパク質が一部の金属化合物とも結合することを見出している [当研究室未発表データ]。以上のことから、疎水性のハプテンや金属ハプテ

ンを評価する際に DPRA と組み合わせて MUP22 タンパク質とハプテンとの結合性評価を行うことで、検出精度を向上させられる可能性があると考えている。

ハプテンとキャリアタンパク質が結合することで抗原となることは広く知られてはいるものの、どのようなタンパク質がキャリアタンパク質として機能するか、また既知のリジンまたはシステイン残基を介した共有結合以外にどのような様式で結合するのかに関してはこれまで知られていなかった。本研究で得られた結果は、MUP22 タンパク質がこれまで知られていたハプテンとキャリアタンパク質との結合とは全く異なる、新たな結合様式によりハプテンと結合する可能性を示唆するものである。さらに MUP22 タンパク質が最終的な感作感受性の増強の段階にも関与していたことから、MUP22 タンパク質を介したハプテンの新たな抗原性獲得機構が存在すると考えられる。また MUP22 タンパク質は構造的な分類としてリポカリンファミリー分子に分類されていることから[38]、構造的に類似している他の *Mups* サブタイプやリポカリンファミリータンパク質もキャリアタンパク質として機能する可能性が考えられる。今後の詳細な解析により、MUP22 タンパク質をはじめとしたリポカリンファミリーの抗原性獲得機構における生理機能が明らかになれば、皮膚感作性試験法の構築のみならずアレルギー性接触皮膚炎治療薬開発等においても重要な知見となることが期待される。

総括

第1章および第2章では DC2.4 細胞皮膚感作性試験が、h-CLAT で検出できなかった HCA や BGP を検出できたことから、h-CLAT に代わる試験法になり得る可能性が示された。また、本評価法は h-CLAT における細胞株を DC2.4 細胞に変更するのみで容易に導入できる点も利点であると考えられる。

第3章では、MUP22 タンパク質を介したハプテンの新たな抗原性獲得機構が存在する可能性が見出された。それに加え、MUP22 タンパク質とハプテンとの結合性を検出する NPN 結合試験のような検出系が、新規皮膚感作性代替法の候補となり得る可能性が示唆された。本研究で得られた知見を足掛かりとして更なる研究を行うことで、新規試験法の構築のみならず、皮膚感作のメカニズム解明や、アレルギー性接触皮膚炎治療薬開発等への応用も期待される。

DC2.4 細胞皮膚感作性試験および MUP22 タンパク質との結合性を指標にした評価法は、間近に迫った動物実験廃止に向けての緊急課題である、動物実験代替法として有用であると考えられる。本研究で得られた知見を利用することにより、既存法で 15-20%であった正しく評価できない化学物質の割合を減少させ、皮膚感作代替法全体としての検出精度の向上に貢献することが期待される。

実験材料および方法

第 1 章

1-1 実験材料および試薬

DNCB、MBT、HCA は被験物質として用い、富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。すべての物質は Dimethyl sulfoxide (DMSO, 富士フィルム和光純薬株式会社)に溶解して用いた。

1-2 細胞培養

DC2.4 細胞はマウスの樹状細胞株[16]であり、Dr. Kenneth Rock (University of Massachusetts Medical Center)よりご供与いただいた。DC2.4 細胞は、非動化した 10% 子牛胎児血清(FCS, Gibco)、0.1 mM の非必須アミノ酸(ナカライテスク)、50 mM の 2-mercaptoethanol(ナカライテスク)を添加した RPMI 1640 培地(ナカライテスク)で培養した。DC2.4 細胞は 37°C、5% CO₂ 環境下で培養し、2-3 日ごとに継代維持した。

1-3 WST-1 アッセイによる用量設定試験

Figure 3 における細胞生存率評価は、WST-1 アッセイにより行い、*in vitro* 抗原性試験の最適濃度を決定した。DC2.4 細胞を 2.5×10^4 cells/100 μ L/well で 96 well

プレート(NUNC/ Thermo Fisher Scientific)に播種し 24 時間後に各濃度の被験物質で処理し、さらに 24 時間培養した。4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate (WST-1、同仁化学研究所)と 1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate (1-methoxy PMS、同仁化学研究所)を 20 mM の 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES) バッファー(pH 7.4)に溶かし、最終濃度が WST-1 ; 0.5 mM、1-methoxy PMS ; 0.02 mM となるように 10 μ L ずつ 96 well プレートの各 well に添加した。その後 37°C、5% CO₂ 環境下で 3 時間培養して、450 nm とリファレンス波長として 655 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio-Rad)により測定した。h-CLAT のガイドラインに従い、75%細胞生存率となる際の濃度(CV75)を式 1 により算出した。

$$\log CV75 = [(75 - c) \times \log d - (75 - a) \times \log b] / (a - c) \quad (\text{式 1})$$

ここで、a は試験群における最小細胞生存率 > 75%、c は試験群における最大細胞生存率 < 75%、b および d はそれぞれ細胞生存率が a および c となった濃度である。

1-4 *In vitro* 抗原性検出試験

細胞種を DC2.4 細胞に変更した以外は、基本的には h-CLAT のガイドラインに準拠して実施した。DC2.4 細胞(1.5×10^5 cells/1 mL/well)を 24 well プレート

(Corning)に播種し、24 時間接着させた後に各濃度の DNCB、MBT、HCA で 24 時間処理した。培養終了時にトリプシン処理により細胞を回収し、PBS で洗浄した後、2% FCS-PBS で再懸濁し、THP-1 細胞と同様の方法で染色した。ただし抗体は、マウス由来の細胞表面分子に特異的な抗体(Mouse BD Fc Block、biotinylated anti-mouse CD54 antibody、biotinylated anti-mouse CD86 antibody、allophycocyanin (APC)いずれも BD Biosciences)を用いた。各細胞株について、30,000 個の細胞を回収し、そのうちの生細胞について CD54 および CD86 の発現量を FACS Verse で解析した。MFI で表される生データを用いて、CD54 および CD86 の発現量の指標である相対蛍光強度(RFI)を以下の式により算出した。

$$\text{RFI (\%)} = 100 \times (\text{被験物質刺激細胞の MFI}) / (\text{溶媒刺激細胞の MFI}) \quad (\text{式 2})$$

h-CLAT のガイドラインに従いいずれかの用量で RFI 値が 200% (CD54)または 150% (CD86)以上であった場合、被験物質は感作性物質であると判断した。

1-5 統計解析

Figure 5 の対照群と処理群のデータは常に同時に行った各群 3 サンプルずつのデータであり、平均値 ± 標準偏差で示した。溶媒群に対して Dunnett の多重比

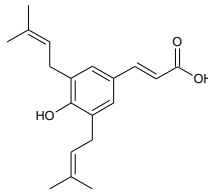
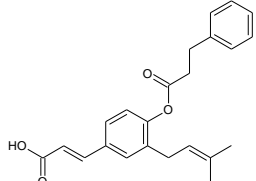
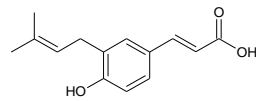
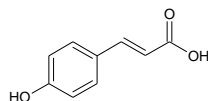
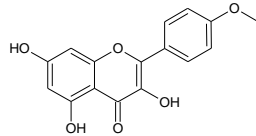
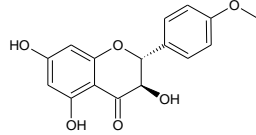
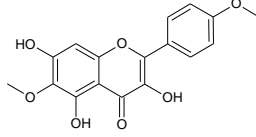
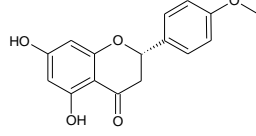
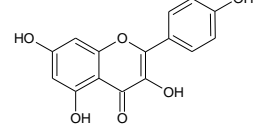
較検定(SPSS Software 15.0J for windows)を行うことにより解析した。 $P < 0.05$ の場合、統計的有意性を示すとした。

第2章

2-1 実験材料および試薬

BGP (Minas Gerais State, Brazil)は、主にキク科バツカリス属の *Baccharis dracunculifolia* を起源植物としている。BGP を 95% (v/v)のエタノール/水混合液で抽出したものをアピ社からご供与いただき、BGP 溶液として使用した。実験に使用した固形 BGP (固形分 55%)の主要成分の含有量を Table 4 に示す。BGP 溶液は、*in vitro* 試験では DMSO に、LLNA 試験ではアセトン/オリーブオイル (4 : 1 v/v, AOO)に溶解した。

Table 4. Components and their contents in Brazilian green propolis (BGP) used in the current study.

Component Classification	Compound Name	Structure	Content (mg/g) ^a
Cinnamic acid derivatives	Artepillin C		163.87
	Baccharin		47.31
	Drupanin		19.89
	<i>p</i> -Coumaric acid		21.95
Flavonoids	Kaempferide		27.79
	Dihydrokaempferide		16.41
	Betuletol		16.44
	Isosakuranetin		4.83
	Kaempferol		2.05

^a The value of content indicates weight (mg) in 1 gram of solid BGP.

2-2 細胞培養

h-CLAT に使用した THP-1 細胞 (NIHS (JCRB) No. JCRB0112.1) は、JCRB Cell Bank (<https://cellbank.nibiohn.go.jp/english/>) より購入した。THP-1 細胞及び DC2.4 細胞は、非動化した 10% FCS、0.1 mM の非必須アミノ酸、50 mM の 2-mercaptoethanol を添加した RPMI 1640 培地で培養した。いずれの細胞も 37°C、5% CO₂ 環境下で培養し、2-3 日ごとに継代維持した。

2-3 フローサイトメトリーによる用量設定試験

Figure 6, 7 での細胞生存率評価は FACS を用いて行い、*in vitro* 抗原性試験の最適濃度を決定した。基本的には OECD TG 442E に収載されている h-CLAT のガイドラインに準拠して試験を行った。THP-1 細胞は 1.0×10^6 細胞/well で 24 well プレート (Corning) に播種し、溶媒または被験物質で 24 時間同時処理した。DC2.4 細胞は 1.5×10^5 細胞/well で 24 well プレートに播種し、24 時間接着させたのちに溶媒または被験物質で 24 時間同時処理した。各細胞ともに、培養終了後に回収し、7-amino actinomycin D (7-AAD, Thermo Fisher Scientific) で死細胞を染色した。その後 FACS Verse (BD Biosciences) により死細胞割合を解析し、式 1 により CV75 を算出した。

$$\log CV75 = [(75 - c) \times \log d - (75 - a) \times \log b] / (a - c) \quad (\text{式 1})$$

ここで、a は試験群における最小細胞生存率 $>75\%$ 、c は試験群における最大細胞生存率 $<75\%$ 、b および d はそれぞれ細胞生存率が a および c となった濃度である。

2-4 実験動物

特定病原体を含まない 8-12 週齢の雌の BALB/cCrSlc マウスを日本エスエルシーから入手した。マウスは、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、12 : 12 時間の明暗サイクル(午前 8 時から午後 8 時まで点灯)に保たれた部屋で飼育し、標準餌(CE-2, CLEA)を与えた。餌と水は自由摂取とした。すべての動物の飼育および取り扱い方法は、岐阜薬科大学の施設動物管理委員会の承認を得た。使用する動物の数および動物の苦痛を最小限に抑えるために動物擁護に十分配慮した。

2-5 LLNA

実験は基本的に OECD TG 429 に記載されている LLNA に準拠して実施した。雌性 8 週齢 BALB/c マウスに、溶媒として AOO、被験物質として HCA または BGP を $25 \mu\text{L}$ ずつ両耳背面に 3 日間連続塗布した。2 日間無処置期間とした後 5 日目にすべてのマウスに 0.25 mL の $[^3\text{H}]$ -チミジン ($20 \mu\text{Ci}$, American Radiolabeled Chemicals)を尾静脈から注射した。5 時間後、マウスをイソフルランの過量投与により安楽死させ、流入領域リンパ節として耳介リンパ節を摘出した。各リンパ

節細胞懸濁液を PBS で洗浄し、遠心分離によりペレット化した後、5 mL の 5% (v/v)トリクロロ酢酸(TCA, 富士フィルム和光純薬株式会社)に再懸濁し、4°Cで 18 時間かけて沈殿させた。細胞液を遠心分離した後、ペレットを 1 mL の 5% TCA に懸濁し、各サンプルを 4 mL のシンチレーションカクテル Clear-sol I (ナカライテスク)と混合した。放射標識体の³H]-チミジンの取り込み量をβシンチレーションカウンティングで測定し、マウス 1 匹あたりの DPM を得た。

2-6 LLNA の結果からの皮膚感作性強度の推定

LLNA では、皮膚感作性の評価は刺激指数(SI)の値に基づいて行われる。増殖活性が溶媒平均の 3 倍以上である化学物質は皮膚感作性があると分類される。SI 値は、各用量群の平均 DPM 値を分子とし、溶媒コントロールの平均 DPM 値を分母として算出した。1 つ以上の濃度で少なくとも 3 倍の増殖を引き起こした場合は、LLNA 試験において被験物質は陽性であると判定される。感作性の指標として式 3 に従って算出した EC3(%)値 (それぞれの溶媒群と比較して 3 倍の SI を誘導する際の濃度)を用いた。

$$EC3 = c + [(3 - d) / (b - d)] (a - c) \quad (\text{式 3})$$

ここで、LLNA の用量反応プロット上の SI 値 3 の直上および直下にあるデータは、それぞれ(a, b)および(c, d)の座標を持つ[48]。EC3 値は、ハプテンをその

感作性強度に応じて極強度($0\% < EC3 < 0.1\%$)、強度($0.1\% \leq EC3 < 1.0\%$)、中等度($1.0\% \leq EC3 < 10\%$)、軽度($10\% \leq EC3 \leq 100\%$)に分類するために用いた[32]。

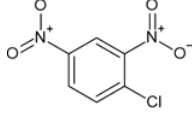
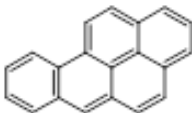
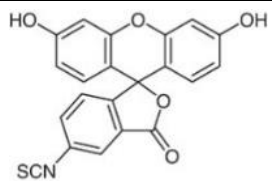
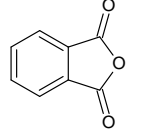
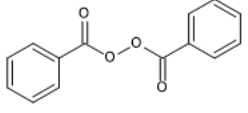
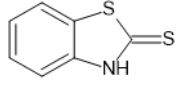
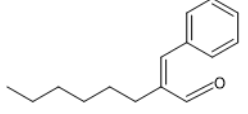
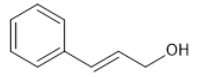
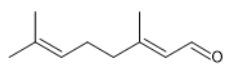
ここでの%は v/v または w/v を示す。

第3章

3-1 実験材料および試薬

IBMP (富士フィルム和光純薬株式会社)および IPMP (東京化成)は MUPs と結合することが既知の化合物であり、N,N-dimethylformamide (DMF, 富士フィルム和光純薬株式会社)に溶解して使用した。今回使用した 9 種類のハプテンはすべて Table 5 に示した。DNCB、MBT、HCA は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。Cinnamyl alcohol、Citral、FITC、PA は東京化成から、BPO と BaP はナカライテスクから入手した。9 種類のハプテンはそれぞれ異なる感作強度を有しており、DNCB、FITC、BaP は極強度感作性物質、BPO と PA は強度感作性物質、MBT は中程度感作性物質、HCA、Citral、Cinnamyl alcohol は軽度感作性物質に分類される [13, 49]。ハプテンについての詳細な情報は Table 5 に示した。

Table 5. Haptens evaluated for bindings to MUP22.

Hapten's name	Potency category of LLNA	Structure	Cas No.
2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)	Extream		97-00-7
Benzo (a) pyrene (BaP)	Extream		50-32-8
Fluorescein 5-Isothiocyanate, isomer I (FITC)	Strong		3326-32-7
Phthalic Anhydride (PA)	Strong		85-44-9
Benzoyl peroxide (BPO)	Strong		94-36-0
2-Mercaptobenzothiazole (MBT)	Moderate		149-30-4
α -Hexyl cinnamaldehyde (HCA)	Weak		101-86-0
Cinnamyl alcohol	Weak		4407-36-7
Citral	Weak		5392-40-5

3-2 プラスミドベクターの作成

NPN による競合阻害実験(NPN 結合実験)に使用する 6 × His タグおよびトリガーファクター(TF)タグを付加した MUP22 タンパク質を発現させるための pCold TF MUP22 プラスミドベクターの作成を行った。*Mup22* の配列(Gene Accession No.NM_001347154.1)は、当研究室で過去に作成した pGEM-MUP22 プラスミド※から、制限酵素サイト NdeI と EcoRI で処理することにより切り出した。その後切り出した *Mup22* 配列を、同じく NdeI と EcoRI で処理した pCold TF 発現ベクター(タカラバイオ株式会社)にライゲーション反応により挿入した。完成した pCold TF MUP22 プラスミドの遺伝子配列は DNA シークエンスで確認した。

※pGEM-MUP22 プラスミドは、C57 BL/6J マウスの肝臓由来 cDNA から Expand High Fidelity PCR System (Roche)を用いて PCR 反応を行い、増幅した *Mup22* 配列を pGEM easy T-vector (Promega)にライゲーション反応により挿入して作成した。

3-3 シークエンス解析

pCold TF MUP22 プラスミドのシーケンス解析は、Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて行なった。プラスミド (300 ng 相当)

を鋳型として、Big Dye 4.0 μL 、5 \times Sequencing Buffer 4 μL 、primer 3.2 μL (pCold I seq FP: 5'-ACGCCATATCGCCGAAAGG-3') を混和し、全量が 20 μL となるように水を加えた。PCR は、96°C で 2 分間変性させた後、[96°C 30 秒 \rightarrow 50°C 15 秒 \rightarrow 60°C 120 秒] を 1 サイクルとして、これを 25 サイクル行なった。反応終了後、反応液全量を 1.5 mL チューブに移し、70% エタノール 80 μL を加えて軽く混和し、室温で 10 分間静置した。その後 15 分間遠心し(18,000 \times g、室温)、上清を取り除いた。次に 70% エタノール 100 μL を加えて軽く攪拌した後、10 分間遠心し(18,000 \times g、室温)、上清を残さないように注意深く取り除いた。チューブ内に残ったサンプルを 5 分間ほど風乾した後、HiDi Formamide 20 μL に溶解した。シーケンス解析を行なう前に、100°C で 3 分間処理し、直後に急冷することによって DNA を変性させた。シーケンス解析は ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いた。

3-4 TF-MUP22 タンパク質の誘導および精製

3-2 で作成した pCold-TF-MUP22 プラスミドを氷上で 10 分間溶かしたコンピテントセル(BL21) 100 μL に形質転換し、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリン(ナカライテスク)を含む Lysogeny Broth (LB)寒天培地に塗布して 37°C で一晩培養した。翌日、コロニーを滅菌爪楊枝でつつき、アンピシリン 10 mg/mL を含む LB 培地 (ナカ

ライテスク) 500 mL で溶液の吸光度 OD 600 が 0.3–0.5 となるまで 37°C で培養した。その後、Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside を最終濃度 0.1 mM になるように添加することでタンパク質発現誘導をかけ、15°C でさらに 24 時間培養した。培養後の培地を遠心分離によりペレット化し、超音波で破碎した。上清を HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich) を充填したクロマトグラフィーカラム (Bio Rad) に加え、His タグ精製を行った。このカラムを充填した Nickel Affinity Gel 体積の 3 倍量の洗浄液(50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH = 8.0、0.3 M NaCl および 10 mM イミダゾール含有)で洗浄した。カラムに溶出液(50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH = 7.5、0.3 M NaCl と 0.25 M イミダゾールを含む)を加え TF-MUP22 タンパク質を溶出した。

3-5 融合タンパク質の検出

タンパク質サンプルは、4 × NUPAGE LDS Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific) を加え 70°C で 10 分間ボイルし、変性させた。水 1.5 mL、アクリルアミド/bis-アクリルアミド 30% 溶液 (Sigma-Aldrich) 7.5 mL、1 M Tris-HCl (pH 8.8) 5.7 mL、10% SDS (富士フィルム和光純薬株式会社) 150 μ L、10% APS (キシダ化学) 150 μ L、TEMED (ナカライテスク) 6 μ L を混合して 15% ゲルを作成し、その上に水 5.35 mL、アクリルアミド/bis-アクリルアミド 30% 溶液 1.95 mL、2 M

Tris-HCl (pH 6.8) 250 μ L、10% SDS 80 μ L、10% APS 80 μ L、TEMED 8 μ L を混合してスタッキングゲルを作製した。作成したゲルを SDS-PAGE Buffer (0.025M Tris、0.192M Glycine、0.1% (w/v) SDS)を入れた泳動槽にセットし、サンプルを各ウェルにアプライしたのちに一定電流で流し、His-tag In-gel Stain (Invitrogen) で His タグ融合 TF-MUP22 タンパク質を検出した。タンパク質染色は添付のプロトコールに従った。ゲルを Fixing solution (メタノール 100 mL, 酢酸 20 mL, 水 80 mL) 200 mL に 1 時間浸した。次に水 200 mL で 10 分間 2 回洗浄し、His-tag In-gel Stain 25 mL に 1 時間浸した。その後 PBS 100 mL で 2 回洗浄し、FLA-5100 (Fuji Film) を用いてバンドを検出した。

3-6 NPN を用いた結合実験

NPN (東京化成工業) を DMF に 100 mM となるように溶解し、NPN ストック溶液を調製した。実験ごとに NPN ストック溶液を DMF で 100 倍希釈し 1 mM とした NPN 溶液を調製した。結合試験は 2,000 μ L の系で行った。50 mM HEPES (ナカライテスク) pH7.5 に対して、結合試験に用いる種々の化合物を Table. 5 に示す濃度、NPN 溶液を最終濃度 1 μ M、TF-MUP22 タンパク質を最終濃度 12 μ g/mL となるように加えた。化合物の溶解に用いた溶媒の量が系ごとに異なると蛍光強度に影響するため、系中の溶媒量は各濃度で等しくなるようにした。また、溶

媒量は全量の 200 分の 1 以下になるようにした。TF-MUP22 タンパク質を加えないサンプル (ブランク) についても同様に調製した。混合液を室温で遮光しながらローテーターを用いて 30 分間転倒混和した。混合液の蛍光スペクトルを FP-6600 (日本分光) を用い、励起波長 337 nm、励起バンド幅 5 nm、蛍光バンド幅 2 nm で測定した。蛍光波長 395 nm の蛍光強度をプロットし、KaleidaGraph v4.1.1 (Synergy Software) を用いて Epps らが報告した式 4 (Figure 13A) で曲線近似し [40]、TF-MUP22 タンパク質と種々の化合物の阻害定数を求めた。

$$f = f_b + \frac{f_0 - f_b}{1 + \frac{I_0}{K_i}} \quad (\text{式 4})$$

3-7 実験動物

CAG プロモーター制御下に *Mup22* 配列を組み込み (Figure 18)、全身で *Mup22* を高発現するトランスジェニック (*Mup22-Tg*) マウスを作製・使用した。このマウスの作製にあたっては、特定非営利活動法人バイオテクノロジー研究開発機構が生成を代行し、7 匹の *Mup22* ファウンダーマウスを得た。そのうち 3 ラインから次世代マウスが生まれ、そのうちの 1 系統を使用した。マウス作成の詳細については、現在投稿論文を作成中である。本実験で使用した *Mup22-Tg* マウスは、特定病原体を含まない BALB/cCrslc マウス (日本エスエルシー) と少なくとも 13 世代にわたって戻し交配し、背景を BALB/cCrslc とした。マウスは、温度

23 ± 2°C、湿度 50 ± 10%、12 : 12 時間の明暗サイクル(午前 8 時から午後 8 時まで点灯)に保たれた部屋で飼育し、標準餌(CE-2, CLEA)を与えた。餌と水は自由摂取とした。本研究におけるすべての動物実験は、「岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会」と「岐阜薬科大学バイオセーフティー委員会」の承認を得て行われており、使用する動物の数および動物の苦痛を最小限に抑えるために動物擁護に十分配慮した。

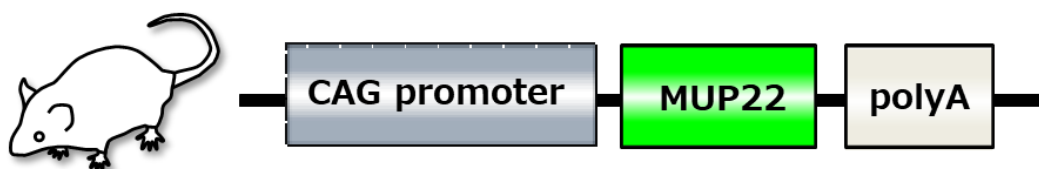


Figure 18. Gene construct of *Mup22*-Tg mice.

CAG promoter; a combination of chicken b-actin promoter and cytomegalovirus immediate-early enhancer.

3-8 Total RNA の調整

RNA 抽出は、臓器とリンパ球細胞で異なる方法により行った。

<臓器からの total RNA 抽出>

ジルコニウムビーズを入れたスクリーキャップ付き 1.5 mL チューブ (Scientific Specialties)に TRI Reagent (MOR Molecular Research Center, Inc.) 1 mL を加えた。組織を上記で用意した 1.5 mL チューブに入れ、ビーズ式ホモジナイザーに設置して 15 sec 攪拌した後、氷冷した。1.5 mL チューブにクロロホルム(ナ

カライテスク) 0.2 mL を加え、1 分間激しく攪拌後、室温で 2-3 分間静置し、4 °C、12,000 g で 15 分間遠心した。上層を別の 1.7 mL コニカルチューブへ移し、クロロホルム 0.5 mL を加え、1 分間激しく攪拌後、4 °C、12,000 g で 5 分間遠心した。上層を別の 1.7 mL チューブへ移し、2-プロパノール(ナカライテスク) 0.4 mL を加え、転倒混和した後室温で 10 分間静置し、4 °C、12,000 g で 20 分間遠心した。上清を除き、75%エタノール溶液を 1 mL 加え、転倒混和し、4 °C、12,000 g で 5 分間遠心した。上清を除き、沈殿を 5-10 分間風乾させた。0.2-0.3 mL の Diethylpyrocarbonate (DEPC)処理水を加え、ピペッティングを行うことにより溶解し-80 °Cで保管した。

<リンパ球細胞からの total RNA 抽出>

マウスの脾臓リンパ球細胞、胸腺リンパ球細胞、すべてのリンパ節リンパ球細胞は、 1×10^6 cells ずつ-80°Cで凍結させた。凍結した細胞をタッピングでほぐし TRI Reagent を 1.0 mL 加えて 20 G 針付シリンジ(テルモ)を用いて針に 10 数回通し、ゲノムの切断を行った。クロロホルムを 0.2 mL 加えて 1 分間激しく攪拌し室温で 2-3 分間静置後、12,000 g、4°Cで 15 分間遠心した。水層を別のチューブに取り、クロロホルム 0.5 mL を加えて 1 分間激しく攪拌し 12,000 g、4°Cで 5 分間遠心した。水層を別のチューブに取り、クロロホルム 0.45 mL を加えて 1 分間

激しく攪拌し 12,000 g、4°Cで 5 分間遠心した。水層を別のチューブに取り、2-プロパノール(ナカライテスク)を 0.4 mL を加え、転倒混和し、室温で 10 分間静置後、12,000 g、4°Cで 20 分間遠心した。上清を除き、得られた沈殿を 75%エタノール 1 mL で洗浄後、風乾させた。沈殿を 10 μ L の DEPC 処理水に溶解し、-80°Cで保存した。

3-9 Single strand cDNA の合成

得られた Total RNA を 260 nm の吸光度を測定した後、その Total RNA 1 μ g に 10 μ M mixed oligo dT primer (TP)を 2 μ L 加え、全量が 5 μ L になるように DEPC 処理水を加えた。70°Cで 5 分間加熱した 4°Cで 5 分間反応させ、反応液 1 とした。5x ImProm-II buffer 4 μ L、20 mM MgCl₂ 2.4 μ L、10 mM dNTPmix 1 μ L、DEPC 処理水を 6.6 μ L を加え、全量 14 μ L とした。これと反応液 1 を混合した後、ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega) 1 μ L を加え、42°Cで 60 分間反応させ、その後氷冷することにより Single strand cDNA を合成した。TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) 60 μ L を加え、希釈した。

TP の配列を以下に示す。

TP : 5'-GCGAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTVN-3'

(V = A or C or G, N = A or C or G or T)

3-10 定量 Real-time RT-PCR

調製した cDNA を鋳型として、LightCycler (Roche Diagnostics) を用いて Real-time RT-PCR を行った。なお、Real-time RT-PCR には、QuantiTect SYBR Green PCR reagent と以下のプライマーおよび条件にて行い、内部標準として *Actb* を用いて各測定値を補正した。

・ *Mup* group 2 primer : (Forward; 5'-CAGACAGACAATCCTATTCCCTACC-3',

Reverse; 5'-GTCAGAGGCCAGGATAATAGTATGCCATTC-3')

・ *Actb* primer : (Forward; 5'-CCCTGAACCCTAAGGCCAACCGTG-3',

Reverse; 5'-GCCTGTGGTACGACCAGAGGCATAC-3')

・ PCR 条件; 95°C 30 sec → (95°C 5 sec 60°C 10 sec) × 45 cycles

3-11 FITC painting assay

抗原提示細胞が抗原を捕捉して活性化してからリンパ節へ移行するまでの段階を評価する方法として、FITC painting assay を行った。Dibutyl phthalate と acetone を 1 : 1 の割合で混合したものを溶媒として、FITC を 8.0 mg/mL に調製した。FITC または溶媒のみを 50 μL、8-12 週齢の雌の *Mup22-Tg* または野生型マウスの両耳に塗布した。6 時間後または 18 時間後に、マウスをイソフルランの過量投与により安楽死させ、流入領域リンパ節として耳介リンパ節を摘出し、リンパ節細胞を個別に採取した。それぞれのリンパ節細胞懸濁液を、2% FCS-PBS で

洗浄し、遠心分離によりペレット化した。一次抗体の非特異的結合を避けるため、Fc 受容体ブロッキング(anti-mouse Fc Block, BD Biosciences)により氷上で 15 分間処理した。2% FCS-PBS で洗浄後、氷上で 30 分間、一次抗体(抗マウス MHC Class II (I-A/I-E) Functional Grade Biotin, Thermo Fisher、Phycoerythrin 抗マウス CD11c 抗体, BD Biosciences)で処理した。2% FCS-PBS で洗浄後、二次抗体として APC-streptavidin (BD Biosciences)を処理した。2% FCS-PBS で洗浄後、7-AAD で死細胞を染色した。FITC の蛍光および APC 標識の MHCII と PE 標識の CD11c の発現量を FACS Verse で解析した。死細胞を含む合計 30,000 個の細胞を解析した。

3-12 LLNA

第 1 章 第 2 節 2.8. LLNA に準じた。ただし、溶媒は AOO を用い、被験物質は HCA 25.0% (v/v)および Cinnamyl alcohol 100% (w/v)を用いた。

3-13 統計

Figure 15 のデータは平均値 \pm 標準偏差で示した。Figure 16 のデータは同時に行ったデータであり、平均値 \pm 標準偏差で示した。野生型マウスと *Mup22-Tg* マウスの FITC 処理群同士の比較を Student's t-test (SPSS Software 15.0J for windows)により行い、 $P < 0.05$ の場合、統計的有意性を示すとした。Figure 17 のデータは、平均値 \pm 標準偏差で示した。野生型マウスと *Mup22-Tg* マウスの処

理群同士の比較を Tukey HSD (SPSS Software 15.0J for windows)により行い、 $P < 0.01$ の場合、統計的有意性を示すとした。

参考文献

1. United Nations. 2011. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (ghs): Fourth Revised Edition. 4th ed. New York, NY: United Nations, Available from: <https://doi.org/10.18356/4255cc90-en>.
2. Vukmanović, S. & Sadrieh, N. (2017). Skin sensitizers in cosmetics and beyond: Potential multiple mechanisms of action and importance of T-cell assays for in vitro screening. *Critical Reviews in Toxicology*, 47(5), 422–439.
3. Olusegun, O. A. & Martincigh, B. S. (2021). Allergic contact dermatitis: A significant environmental and occupational skin disease. *International Journal of Dermatology*, 60(9), 1082–1091.
4. Uter, W., Werfel, T., White, I. & Johansen, J.D. (2018). Contact allergy: a review of current problems from a clinical perspective. *International journal of environmental research and public health*, 15(6), 1108.
5. Thorne, P. S., Hawk, C., Kaliszewski, S. D. & Guiney, P. D. (1991). The noninvasive mouse ear swelling assay. I. Refinements for detecting weak contact sensitizers. *Fundamental and Applied Toxicology*, 17(4), 790-806.
6. Adler, S., Basketter, D., Creton, S., Pelkonen, O., Van Benthem, J., Zuang, V., Andersen, K.E., Angers-Loustau, A., Aptula, A., Bal-Price, A. & Benfenati, E. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of toxicology*, 85(5), 367-485.
7. EU. 2009. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. *Off J Eur Union L*, 342, 1–59.; Available from: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:en:PDF>
8. EU. 2016. Commission regulation (EU) 2016/1688 of 20 September 2016 amending Annex VII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals (REACH) as regards skin sensitisation. *Off J Eur Union L*, 59:14–16; Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX%3A32016R1688&from=EN>
9. 資生堂, 動物実験と代替法に対する取り組み; Available from: <https://corp.shiseido.com/jp/sustainability/consumer/experiment/>

10. 花王グループ, 動物実験に対する方針; Available from:
<https://www.kao.com/jp/corporate/sustainability/topics-you-care-about/animal-testing-policy/>
11. ENV/JM/MONO(2012)10/PART1, Organisation de Coopération et de Développement Économiques Organisation for Economic Co-operation and Development 04-May-2012; Available from:
[https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2012\)10/part1&doclanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)10/part1&doclanguage=en)
12. Nukada, Y., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Hirota, M., Sakaguchi, H., Sasa, H. & Nishiyama, N. (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(7), 1150-1160.
13. Takenouchi, O., Miyazawa, M., Saito, K., Ashikaga, T. & Sakaguchi, H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic chemicals with high octanol-water partition coefficients. *The Journal of Toxicological Sciences*, 38(4), 599-609.
14. Berges, C., Naujokat, C., Tinapp, S., Wieczorek, H., Höh, A., Sadeghi, M., Opelz, G. & Daniel, V. (2005). A cell line model for the differentiation of human dendritic cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 333(3), 896-907.
15. Schwende, H., Fitzke, E., Ambs, P. & Dieter, P. (1996). Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Journal of leukocyte biology*, 59(4), 555-561.
16. Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G. & Rock, K. L. (1997). Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *The Journal of Immunology*, 158(6), 2723-2730.
17. dos Santos, G. G., Reinders, J., Ouwehand, K., Rustemeyer, T., Scheper, R. J. & Gibbs, S. (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(3), 372-382.
18. Bankova V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2(1), 29-32.

19. de Groot, A. C. (2013). Propolis: a review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermatitis*, 24(6), 263-282.
20. Berretta, A. A., Arruda, C., Miguel, F. G., Baptista, N., Nascimento, A. P., Marquele-Oliveira, F., Hori, J. I., Barud, H., Damaso, B., Ramos, C. & Ferreira, R. (2017). Functional properties of Brazilian propolis: from chemical composition until the market. In *Superfood and functional food-an overview of their processing and utilization*, 4, 55-96.
21. Talas, Z. S., Gulhan, M. F., Erdogan, K. & Orun, I., (2014). Antioxidant effects of propolis on carp *Cyprinus carpio* exposed to arsenic: biochemical and histopathologic findings. *Diseases of aquatic organisms*, 108(3), 241-249.
22. Machado, B. A. S., Barreto, G. D. A., Costa, A. S., Costa, S. S., Silva, R. P. D., da Silva, D. F., Brandao, H. N., da Rocha, J. L. C., Nunes, S. B., Umsza-Guez, M. A. & Padilha, F. F. (2015). Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent. *PLoS One*, 10(8), e0134489.
23. Devequi-Nunes, D., Machado, B. A. S., Barreto, G. D. A., Rebouças Silva, J., da Silva, D. F., da Rocha, J. L. C., Brandão, H. N., Borges, V. M. & Umsza-Guez, M. A. (2018). Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLoS One*, 13(12), e0207676.
24. Badr, G., Sayed, E.A., Waly, H., Hassan, K. A., Mahmoud, M. H. & Selamoglu, Z. (2019). The Therapeutic Mechanisms of Propolis Against CCl₄-Mediated Liver Injury by Mediating Apoptosis of Activated Hepatic Stellate Cells and Improving the Hepatic Architecture through PI3K/AKT/mTOR, TGF- β /Smad2, Bcl2/BAX/P53 and iNOS Signaling Pathways. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 53(2), 301-322.
25. Uter, W., Bauer, A., Belloni Fortina, A., Bircher, A. J., Brans, R., Buhl, T., Cooper, S. M., Czarnecka-Operacz, M., Dickel, H., Dugonik, A. & Geier, J. (2021). Patch test results with the European baseline series and additions thereof in the ESSCA network, 2015-2018. *Contact dermatitis*, 84(2), 109-120.
26. Petersen, H. O. (1977). Hypersensitivity to Propolis. *Contact Dermatitis*, 3(5), 278–279.

27. Hausen, B. M., Wollenweber, E., Senff, H. & Post, B. (1987). Propolis allergy. (II). The sensitizing properties of 1, 1-dimethylallyl caffeic acid ester. *Contact Dermatitis*, 17(3), 171-177.
28. Hausen, B. M., Evers, P., Stüwe, H. T., König, W.A. & Wollenweber, E. (1992). Propolis allergy (IV) Studies with further sensitizers from propolis and constituents common to propolis, poplar buds and balsam of Peru. *Contact Dermatitis*, 26(1), 34-44.
29. Yang, C., Luo, L., Zhang, H., Yang, X., Lv, Y. & Song, H. (2010). Common aroma-active components of propolis from 23 regions of China. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(7), 1268-1282.
30. Bogdanov, S. (2017). Propolis: Biological Properties and Medical Applications; *The Propolis Book*, Chapter 2.
31. Angers-Loustau, A., Tosti, L. & Casati, S. (2011). The regulatory use of the Local Lymph Node Assay for the notification of new chemicals in Europe. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 60(3), 300-307.
32. Kimber, I., Basketter, D. A., Berthold, K., Butler, M., Garrigue, J. L., Lea, L., Newsome, C., Roggeband, R., Steiling, W., Stropp, G. & Waterman, S. (2001). Skin sensitization testing in potency and risk assessment. *Toxicological Sciences*, 59(2), 198-208.
33. Gerberick, G. F., Vassallo, J. D., Bailey, R. E., Chaney, J. G., Morrall, S. W. & Lepoittevin, J. P. (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicological sciences*, 81(2), 332-343.
34. Miyazaki, H., Samejima, Y., Iwata, K., Minamino, Y., Hikida, S., Ariumi, H., Ikeda, H., Hamada, Y., Yamashita, K. & Usui, K. (2020). Mass Spectrometry-Based Solid Phase Peptide Reaction Assay for Detecting Allergenicity Using an Immobilized Peptide-Conjugating Photo-Cleavable Linker. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 8332.
35. Zhang, F., Erskine, T., Klapacz, J., Settivari, R. & Marty, S. (2018). A highly sensitive and selective high pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC/MS-MS) method for the direct peptide reactivity assay (DPRA). *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 94, 1-15.
36. Flower, D. R. (1996). The lipocalin protein family: structure and function. *Biochemical journal*, 318(1), 1-14.
37. Sharrow, S. D., Vaughn, J. L., Židek, L., Novotny, M. V. & Stone, M. J. (2002). Pheromone binding by polymorphic mouse major urinary proteins. *Protein Science*, 11(9), 2247-2256.

38. Charkoftaki, G., Wang, Y., McAndrews, M., Bruford, E. A., Thompson, D. C., Vasiliou, V. & Nebert, D. W. (2019). Update on the human and mouse lipocalin (LCN) gene family, including evidence the mouse Mup cluster is result of an “evolutionary bloom”. *Human genomics*, 13(1), 1-14.
39. Cavaggioni, A., & Mucignat-Caretta, C. (2000). Major urinary proteins, α 2U-globulins and aphrodisin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482(1-2), 218-228.
40. Epps, D. E., Raub, T. J., & Kezdy, F. J. (1995). A general, wide-range spectrofluorometric method for measuring the site-specific affinities of drugs toward human serum albumin. *Analytical biochemistry*, 227(2), 342-350.
41. Darwish Marie, A., Veggerby, C., Robertson, D.H., Gaskell, S.J., Hubbard, S.J., Martinsen, L., Hurst, J.L. and Beynon, R.J. (2001). Effect of polymorphisms on ligand binding by mouse major urinary proteins. *Protein Science*, 10(2), 411-417.
42. Pertinhez, T. A., Ferrari, E., Casali, E., Patel, J. A., Spisni, A. and Smith, L.J. (2009). The binding cavity of mouse major urinary protein is optimised for a variety of ligand binding modes. *Biochemical and biophysical research communications*, 390(4), 1266-1271.
43. Bingham, R. J., Findlay, J. B., Hsieh, S. Y., Kalverda, A. P., Kjellberg, A., Perazzolo, C., Phillips, S. E., Seshadri, K., Trinh, C. H., Turnbull, W. B. and Bodenhausen, G. (2004). Thermodynamics of binding of 2-methoxy-3-isopropylpyrazine and 2-methoxy-3-isobutylpyrazine to the major urinary protein. *Journal of the American Chemical Society*, 126(6), 1675-1681.
44. Finlayson, J. S., Asofsky, R., Potter, M., & Runner, C. C. (1965). Major urinary protein complex of normal mice: origin. *Science*, 149(3687), 981-982.
45. Stopka, P., Kuntová, B., Klempt, P., Havrdová, L., Černá, M. & Stopková, R. (2016). On the saliva proteome of the Eastern European house mouse (*Mus musculus musculus*) focusing on sexual signalling and immunity. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.
46. U.S. EPA’s EPI Suite (United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, U.S.A. 2012); Available from: <https://www.epa.gov/newsreleases/epa-finalizes-guidance-waive-toxicity-tests-animal-skin>
47. ペプチド結合性試験 (Direct Peptide Reactivity Assay : DPRA) の

評価会議報告: Available from: https://www.jacvam.jp/files/news/20150303_2.pdf

48. Basketter, D. A., Lea, L. J., Dickens, A., Briggs, D., Pate, I., Dearman, R. J., & Kimber, I. (1999). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. In *Journal of Applied Toxicology*, 19(4), 261-266.
49. Samuelsson, K., Simonsson, C., Jonsson, C. A., Westman, G., Ericson, M. B., & Karlberg, A. T. (2009). Accumulation of FITC near stratum corneum—visualizing epidermal distribution of a strong sensitizer using two-photon microscopy. *Contact dermatitis*, 61(2), 91-100.

謝辞

本研究に関して、指導教官として終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました恩師
岐阜薬科大学 生命薬学大講座 衛生学研究室 中西 剛 教授に謹んで感謝の意
を表します。

本研究の推進に当たり、直接の御指導ならびにご助言をいただきました岐阜
薬科大学 生命薬学大講座 衛生学研究室 松丸 大輔 講師および石田 慶士 助
教に深謝いたします。

本研究の遂行にあたりご指導ご協力を賜りました、岐阜医療科学大学 永瀬
久光 教授、井戸 章子 講師、鈴鹿医療科学大学 廣森 洋平 助教に感謝いたしま
す。

本研究の遂行にあたり、DC2.4 細胞を御供与いただきました、K.L. Rock 氏に
多大なる感謝の意を表します。

本研究における実験の実施にあたりご協力いただきました、田中 健人 修士、
高野 恭平 修士、山本 勝也 氏、野口 菜都実 氏、諸先輩、同期、後輩、衛生学
研究室諸氏に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、ブラジル産グリーンプロポリスを御供与いただきま
した アピ株式会社 に深く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり多大なるご支援を賜りました、日本学術振興会に深謝致します。

最後に、研究に専念できる環境、時間を与えてくださり、長い学生生活を終始温かく見守って下さった家族に心から感謝の意を捧げます。