

ペプチドビーズを用いた反応速度論による 迅速・詳細なアレルギー感作試験法の開発

甲南大学フロンティアサイエンス学部

臼井 健二

The direct peptide reactivity assay (DPRA) detects binding of test chemical samples to lysine or cysteine of the test peptides as a prominent alternative to animal testing for sensitization. However, DPRA cannot measure binding of poorly water-soluble samples to the test peptides, and the HPLC step in DPRA is time-consuming and technical in comparison with other general measurements. Recently, we had constructed the chromophore solid phase peptide reaction assay (C-SPRA) as an alternative skin sensitization assay system to solve these problems. In this study, we further improved C-SPRA system for detecting various and numerous samples in a short period of time (a few hours).

At first, we selected a microbead for immobilization of the test peptides, PEGA (Poly[acryloyl-bis(aminopropyl) polyethylene glycol]) resin was selected as much more suitable for the quick reaction. Then we optimized the protocol. Especially, the preparation of the peptide-microbeads before the assay was simplified. Using PEGA resin we found that in the preparation we could skip the swelling step every time. These studies effectively modified the conventional C-SPRA. Our method allows a next-generation high-throughput alternative measurement to animal testing for in vitro skin sensitization rapid assessment with easy handling in a few hours.

1. 緒 言

化粧品およびその関連物質によるアレルギー発症や、悪化リスクの防止は、コスメトロジー、化粧品開発において重大な課題となる。開発段階における感作試験においては、実際にヒトへのテストは現実的ではなく、動物実験に頼らざるを得ないのが現状である。しかしながら、近年、倫理的観点、コストの問題などから動物実験や臨床試験に頼らない、代替法が求められている。皮膚感作性試験代替法の一つである、Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)¹⁾は有効な手法であると考えられている。DPRAは生体内の感作反応を模倣し、ペプチドと被験物質とを反応させた後にHPLCを用いて未反応ペプチドを測定し、その減少率から感作性を予測する試験法である。DPRAは現状の代替法の中でも有効な手法ではあるが、油性物質などの難水溶性物質を評価できない、操作が煩雑、効率性が悪いなどの問題点も多い。我々はこれまで、分析化学とペプチド工学を融合させた新手法(C-SPRA)^{2,3)}の構築を行ってきた(図1)。C-SPRAはDPRAを基礎としているものの、従来の最大の懸念であった、非水溶性・疎水性の物質、界面活性剤などの両親媒性物質ともに試験が可能となる、試験物質の守備範囲が広い方法であり、また操作も簡便な手法である。具体的には、DPRAで使用するペプチドを、ビ

ーズ上に固定する。本ビーズは、有機溶媒中・水中どちらにもなじみ、膨潤するものを使用する。特に難水溶性試験物質を有機溶媒中に溶かしこみ、そこに本ビーズを投与すれば、ビーズに固定したペプチドが試験物質と容易に接触できるようになる。これにより感作性試験が可能となり、試験終了後は、ビーズをとどめることができるフィルター付きカラムを用いることで、試験溶液を洗い流すことができる。さらにNH₂基・SH基指示薬を組み合わせることで、分光法で検出可能な極めて簡便な試験法である。しかしながら、依然として測定に時間がかかること、また感作性の有無の定性的結果のみを採用しているため詳細解析が行えないことなどが欠点として挙げられる。そこで、本研究では24時間反応ではなく、1時間程度の短い反応時間で指示薬の結合度合いを算出し、反応速度論的解析を試みることで、従来法よりも迅速かつ詳細な解析が可能な手法へと改良することを目的とした。

2. 方 法

①ビーズ・指示薬の選択

これまでC-SPRAで用いていたNH₂基指示薬であるピクリン酸⁴⁾とSH基指示薬であるエルマン試薬⁵⁾を用いて、研究を進めていくことにした。さらに、ビーズについては、これまで使用していたポリスチレン系のビーズでは、反応場がビーズ奥深くまであるため、試験物質や指示薬が、到達しなかったり、吸着したりといった懸念もあるので、そのような心配のないビーズ(アクリルアミド系のビーズ: PEGAビーズ)を検討した。

②操作法の確立

実際に1時間以内といった短時間でのテスト物質との反

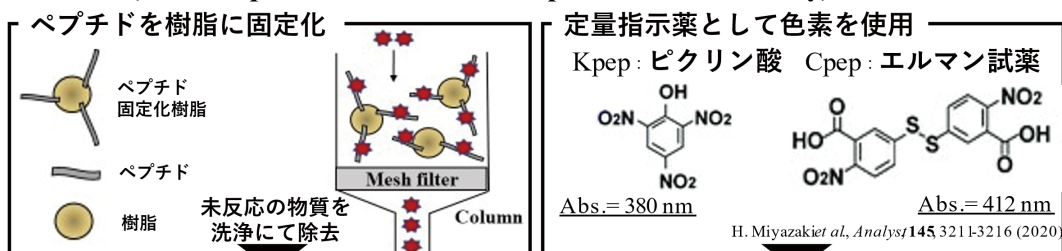


Development of the rapid chromophore solid phase peptide reaction assay (C-SPRA) for sensitization assessment as alternatives to animal testing

Kenji Usui

Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University

C-SPRA (Chromophore– Solid Phase Peptide Reaction Assay)法 DPRA 法を改良



溶媒の置換、疎水性物質の測定が可能

UV-Vis測定での感作性評価が可能

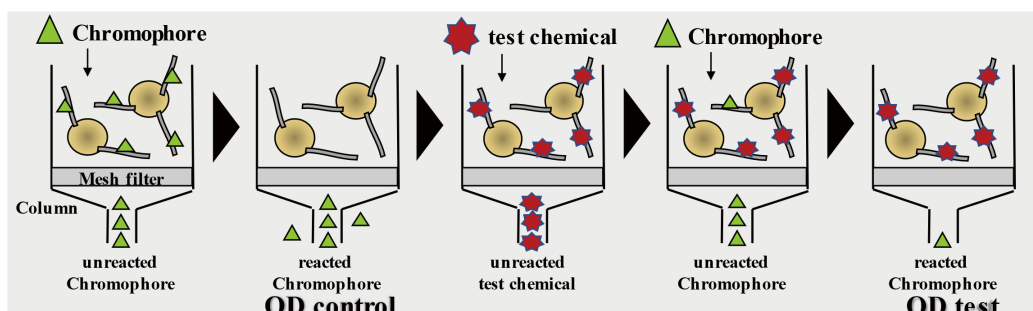


図1 C-SPRA法の概要

応を行った後に、指示薬の結合に有意な差が出るのかについて検討を行い、反応時間の短縮化・最適化を行った。

③本システムの有用性の検証実験

簡便さを求めるために操作に慣れていない専門性の低い学部1、2年生の学生に試験を行ってもらった。また、代表的な化粧品材料となる天然物や、よく知られる感作性物質数十種類を用い、実際の感作性試験を行い、その有用性の検証を行った。

3. 結果と考察

①について

まず、ビーズの検討においてはPEGAビーズを用いた検討を行った。ペプチド合成においては、従来から用いているLysine (Lys, K) 含有ペプチドとCysteine (Cys, C) 含有ペプチドを、βアラニンを介してビーズと結合させた配列を、これまでに確立した最適化されたFmoc固相合成法により高純度のペプチド固定化ビーズを得ることに成功した。またこのビーズは、常に膨潤状態で取り扱うため、試験前に膨潤させる必要がないため、準備操作が簡便となることがわかった。

②と③について

反応時間においては24時間反応が従来のポリスチレンとほぼ同じ結果となることを確認したのちに、反応時間を徐々に減らしていき、最終的に、30分反応、10分反応での感作性有無の判定までもが、数種類の試験物質において

可能となる結果が得られた(図2)。すなわち、感作性があるといわれているBQ、FITC、MPH、ACAにおいては、OECDプロトコルと同じ判定方法を用いれば、K含有ペプチド(Kpep)、C含有ペプチド(Cpep)のいずれか一方が感作性あり(P)と検出されれば、判定はPとなり、IPAや試験物質なしのネガコンでは、どちらのペプチドを用いた場合でも感作性なし(N)と検出され、判定はNとなり、従来法と同様の判定結果となった。

残念ながら当初の予定であった反応速度を求めて詳細解析を行う計画は、PEGAにおいても樹脂内部への試験物質などの拡散速度や、固定化ペプチドの溶液中のような拡散がみられないことを考慮に入れて解析しなければならず、簡便・迅速計測には向かないことが分かった。そこで、より簡便さや迅速さを追求した改良や検証、弱い感作性物質の簡便検出についての確立を行った。その結果、まず操作方法などの最適化を行った結果、本試験は学部1、2年生が行っても、良好な結果が得られることがわかり、汎用性が高いことが分かった。さらに、弱い感作性物質の検出においては、通常のプロトコルよりも、濃度を濃くした条件で、ネガコンと比べて有意な減少率が得られたことから、弱い感作性を検出・判定する手法が確立できた。

4. 総括

以上のように、従来使用していたビーズの材質を変更することにより、本研究では当初の計画の1時間程度よりもさらに短い、10分という反応時間で指示薬の結合度合いを算出してアレルギー感作性の判定が可能な手法へと改

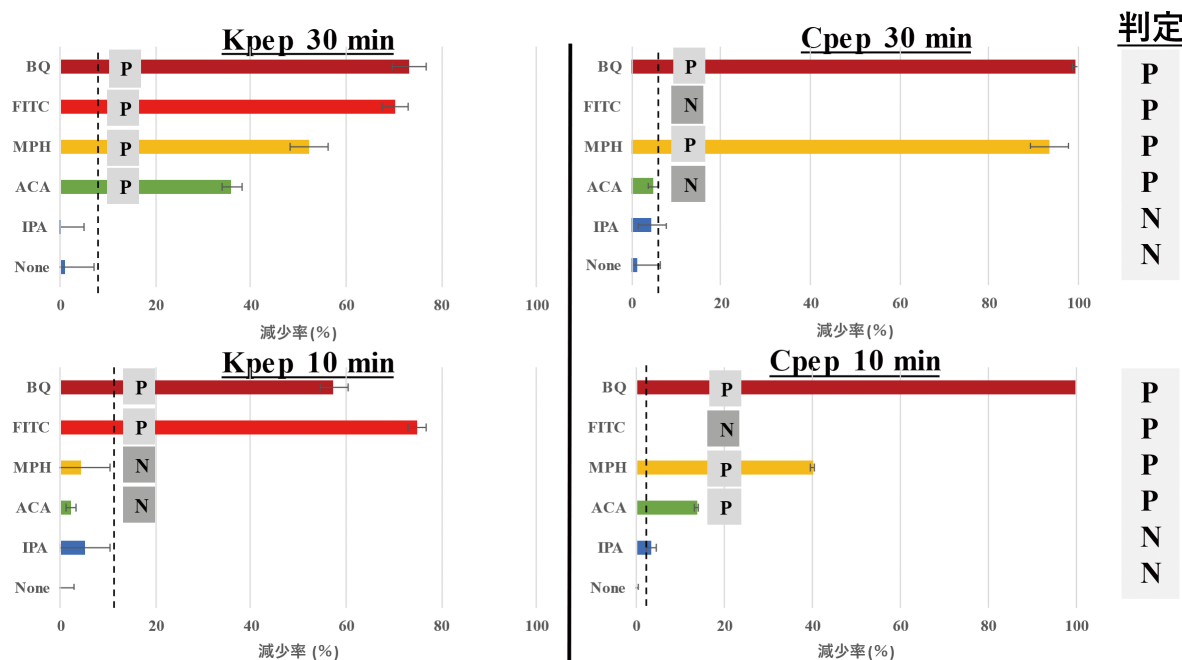


図2 PEGA ビーズに固定化した Kpep、Cpep を用いた 30 分反応、10 分反応のアレルギー感作試験

良することに成功した。現在、これまでの結果をまとめたものを論文投稿中であり、近日中の発行を目指す⁶⁾。また C-SPRA に関する解説記事も発行された⁷⁾。本法が開発できれば、誰でも簡単に動物実験も使わずに感作性試験を行うことができ、化粧品をはじめとする有用物質の探索・開発に大いに貢献できると考えられる。これにより、日本のコスメトロジー、化粧品業界のみならず、世界においても本法は、スタンダードとなる有力な手法となることが期待できる。

謝 辞

本研究の遂行にご協力いただきました共同研究者の皆様、特に浜田芳男博士、栢森史浩博士（甲南大学）、有海秀人博士（山口東京理科大学）、そして甲南大学・山口東京理科大学にて携われた学生の皆様に感謝申し上げます。

最後に本研究の遂行にあたり、多大なるご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) OECD Test Guideline 442C, In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) (2015).
- 2) H. Miyazaki, Y. Hamada, H. Takaishi, Y. Minamino,

H. Ikeda, H. Mekata, M. Takaishi, K. Yamashita, K. Usui, Development of a Chromophore-Solid Phase Peptide Reaction Assay (C-SPRA) for Assessing Skin Sensitization In Vitro, *Analyst*, **145**, 3211-3216 (2020)

- 3) H. Miyazaki, H. Takaishi, H. Ikeda, H. Ariumi, Y. Hamada, K. Yamashita, K. Usui, Synthesis of Peptide-Immobilized Magnetic Beads, and Peptide Reactivity Assay for Assessing Skin Sensitization Utilizing Chromophore, *Processes*, **8**, 1257 (2020)
- 4) B.F. Gisin, The Monitoring of Reactions in Solid-Phase Peptide Synthesis with Picric Acid, *Anal. Chim. Acta.*, **58**, 248-249 (1972)
- 5) G. L. Ellman, Tissue Sulfhydryl Groups, *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77 (1959)
- 6) K. Usui, H. Miyazaki, M. Fukuda, A. Nishimura, M. Maeda, S. Yamaguchi, H. Ikeda, Y. Hamada, K. Yamashita, F. Kayamori, H. Ariumi, Fast and User-Friendly Chromophore-Solid Phase Peptide Reaction Assay (FC-SPRA) for Assessing Skin Sensitization, *Submitted*.
- 7) 臼井健二, 宮崎 洋, 山下 邦彦, 栢森 史浩, 有海秀人, 様々な分野に適用可能な皮膚感作性試験法の開発, *アレルギーの臨床*, 2023 年 11 月号, 75-79 (2023)