

ダイセル化学工業（株）より提案のあった

皮膚感作性試験代替法 (LLNA-DA 法) の一次評価報告書

要旨

平成15年度の厚生科学研究班の決定により、ダイセル化学工業（株）から提案のあった皮膚感作性試験 Local Lymph Node Assay (LLNA) の放射性同位元素 (RI) 標識化合物を用いない代替法 (LLNA-DA 法) を評価した。評価委員会では感作性試験評価ワーキンググループ (WG) を組織した。WG は申請者データに基づいて一次評価を行い、本試験法は原法である LLNA 法とほぼ同様の原理による方法であること、ほとんど同一の識別能力を持つこと、RI を用いないこと、簡便であり、短時間で結果が得られるといった利点があると判断した。しかし、行政試験法として評価する為には、更にデータの信頼性や施設間ばらつきについての情報を得る必要があることから、多施設バリデーションの実施を日本動物実験代替法学会バリデーション委員会に依頼することとした。

A. 目的

医薬品等の皮膚感作性は主にモルモットを用いた Maximization 法やその変法などで評価されてきたが、定量性に乏しいことや動物にストレスを与えることによる動物愛護の面で問題もあり、新しい方法が求められてきた。最近、定量性のある試験法として Kimber ら (1986) や Basketter ら (1996) によりマウスを用いる Local Lymph Node Assay (LLNA) が提案され、欧米を中心にバリデーションが行われ、広く使用されるようになった。OECD の安全性試験法ガイドラインとしても 2002 年に承認された (OECD Guideline 429 Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, adopted 24th April 2002)。しかし、この方法は 3H で標識されたチミジンの DNA への取り込みを指標とする方法であるため、RI の取扱い規制の厳しい日本での普及は不十分であった。RI を用いない方法として BrdU の取り込みをみる方法 (Takeyoshi et al 2003) も報告されているが、まだ、十分にバリデートされていない。一方、ダイセル化学工業 (株) の山下と出原は ATP 含量を測定する方法を独自に開発し、代替法に関する厚生労働科学研究班 (主任研究者 大野泰雄) に評価を依頼するため新しい動物実験代替法として応募した。研究班ではこの方法が RI を用いないという利点以外にも簡便で、かつ時間のかからない方法であり、評価するに値する方法であると考え、日本動物実験代替法学会 (代替法学会) に評価を依頼した。これを受け、代替法学会では評価委員会において、平成 16 年度より検討を行った。なお、本試験法については多施設によるバリデーションが実施されていないことから、評価委員会で検討したのち、適切と判断された場合には施設間バリデーションを行うように勧告し、その結果を待って、再度評価することになる。

B. 評価方法

B-1) 評価組織

従来の評価委員会は光毒性試験代替法の評価のために組織されたものであり、必ずしも感作性試験代替法の評価に相当では無かった。そこで、これとは別に感作性試験の専門家、代替法評価の経験のある専門家、および統計の専門家によりワーキンググループを組織した。また、オブザーバーとして、医薬品審査担当者の参加を求めた。以下に委員の名簿を示す。

評価委員会

委員長

田中憲穂 (食品薬品安全センター秦野研究所) 2004 年 12 月まで
大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所・薬理部) 2005 年 1 月より

副委員長

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所・薬理部 2005 年 12 月まで)
金澤由基子 (食品薬品安全センター秦野研究所・毒性部 2005 年 1 月より)

委員

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所・療品部)
高木弘毅 (アベンティス ファーマ株式会社 研究開発部門 医薬開発本部 統計解析・データマネジメント部 統計解析室)
筒井尚久 (三菱ウェルファーマ 研究本部 安全性研究所)
手島玲子 (国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部)
萩野滋延 ((株) 資生堂、安全性・分析センター 代替法開発プロジェクト室)
牧 栄二 ((財) 食品農医薬品安全性評価センター)

オブザーバー

笛木 修 ((独) 医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部)

B-2) 提案者

提案者はダイセル化学工業 (株) 総合研究所 評価・解析センター 山下邦彦、出原賢治

B-3) 秘密の保持と評価結果の公表について

審議結果は公開シンポジウムや研究報告書等で公開することを前提にしているが、個人の経歴に関する情報は公開せず、また、委員にも配布せず、事務局で保管し、必要に応じて口頭あるいは書面提示の上で説明するべきとされた。また、今回の申請資料に掲載されたデータに基づいて今回の目的を越えて、利用、解析、公表する際には個別に申請者に了解を得なければならないとされた。なお、既に論文等に発表されたデータの利用は自由とされた。

B-4) 評価に使用した資料および会議資料

主に、ダイセル化学工業 (株) より提供を受けた資料、生データおよび集計データに基づいて評価した。な

お、ダイセル化学工業（株）から申請時に提供された資料は以下のとおり。

代替試験法申請書類、皮膚感作性試験：LLNA-DA 法、ダイセル化学工業（株）評価解析センター
資料 1）代替しようとする試験法の名称および代替法の名称

資料 2）LLNA に関する資料

資料 3）LLNA-DA の原理

資料 4）LLNA-DA のプロトコール

資料 5）LLNA-DA で評価した被験物質リスト

資料 6）LLNA-DA 試験結果

資料 7）LLNA-DA の感度、特異性、予測性、一致率及びその他の特徴

資料 8）LLNA-DA の特徴

資料 9）その他、データ解析上有用な資料（生データ等）

資料 8）論文（または、学会発表資料&印刷中の論文原稿）

添付資料 8-1）出原賢治、山下邦彦、福田徳雄、山岸学、河田直紀、非-RI LLNA 試験法の検討、第 17 回日本動物実験代替法学会発表資料 (2003. 11. 7)

添付資料 8-2）出原賢治、山下邦彦、福田徳雄、山岸学、河田直紀、非-RI LLNA を用いた新規な化学物質の皮膚感作性評価、第 17 回日本動物実験代替法学会発表資料 (2003. 11. 7)

添付資料 8-3）非-RI LLNA 法の検討とリスクアセスメントへの応用、第 10 回日本免疫毒性学会学術大会発表資料 (2003. 9. 25)

添付資料 8-4）非 RI LLNA 法による皮膚感作性試験方法の検討と応用、第 76 回日本産業衛生学会発表資料 (2003. 4. 23)

添付資料 8-5）Yamashita K. et al, Development of modified local lymph node assay using measure as an endpoint, Alternatives to Animal testing and Experimentation (投稿中)

資料 9）OECD guideline for the testing of chemicals 429, Skin sensitization: Local lymph node assay (adopted 24th April, 2002)

資料 10）ICCVAM immunotoxicology working group-based on an independent expert peer review panel evaluation of the LLNA. Protocol: Murine Local Lymph Node Assay (LLNA): Assessment of allergic contact dermatitis potential (January 2001)

また、以下の文書を参考資料として用いた。

- 1) ICCVAM, The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM): February 1999.
- 2) OECD, Draft guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment (3rd version), 25 January 2005.

会議の記録、および申請後に提出された主な文書は以下のとおり。

- 1) 第一回 LLNA-DA 評価会議 (2004. 7. 20) 議事録
- 2) LLNA 評価ワーキンググループ、LLNA-DA 法についてのダイセルへの質問 (2004. 8. 14)
- 3) 出原賢治、山下邦彦、第 1 回評価委員会でのご質問に対する回答 (040917)
- 4) 第二回 LLNA-DA 評価委員会議 (2004. 10. 15) 議事録
- 5) 第三回 LLNA-DA 評価委員会議 (2005. 1. 25) 議事録
- 6) 出原賢治、山下邦彦、リンパ球サブクラスの解析結果報告 (2004. 12. 26)
- 7) LLNA 評価ワーキンググループ、リンパ球サブクラスへの影響の検討実験についてのコメント (2005. 1. 25)

B-5) 評価の方法

評価委員会では、事前に資料を委員に配布した上で、会議を開催し、光毒性試験代替法を評価したときの経験を基に事務局が作成した評価の要点（ダイセルより提案された皮膚感作性試験代替法 (LLNA-DA 法) の評価委員会での評価について）を参考に、申請者により提出された申請内容を評価した。委員より出された疑問点について申請者に問い合わせ、その回答を踏まえ一次評価を行った。なお、今回の申請では多施設によるバリデーション結果は添付されていないことから、最終評価は行えなかった。一次評価の結果多施設でバリデーションする価値があるとされた場合には代替法学会にそれを依頼する。その際、評価委員会の審議によりプロトコール等が若干修飾される可能性があるが、その際は申請者の意向を尊重することとした。

評価委員会では平成16年度において3回の会議を開催し、ダイセルより提供された申請資料を評価した。その結果はB-3)項に記載した議事録にまとめた。

C. 評価結果

C-1) 代替しようとする試験法

皮膚感作性試験はモルモットを用いた試験法が主に使用されてきた。OECDガイドラインに掲載された方法としては、guinea-pig maximization test (GPMT)およびBuehler assay (BA)がある。これらの試験法は、感作誘発期の皮膚反応を肉眼的に観察・評価することにより、モルモットに対する化学物質の感作性の有無を検出するものである。しかし、評価が主観的であること、試験に5週間を要すること、コストおよび感作誘発による動物へのストレスの問題がある。

Local lymph node assay (LLNA)法はKimberら(1986)により提案された皮膚感作性試験であり、マウス耳介に3日間連続して被験物質を塗布し、6日目に³H-Methyl thymidineまたは¹²⁵I-Iododeoxyuridineを静脈内投与し、5時間後に摘出したリンパ節より調製したリンパ球懸濁液の放射能を測定することにより、局所リンパ節中の細胞増殖反応を評価する試験法であり、溶媒対照群の3倍以上の結果が得られたときに陽性と判定される。この方法は基本的に感作誘導期における反応を調べる方法で、従来の方法と比べ、以下のようなメリットがある。

- 1) 試験期間が1週間と短い
- 2) 結果が数値として得られるため、客観的かつ定量的
- 3) リンパ球の増殖は被験物質の量および感作性能に相関して起こるため、用量依存性がある。
- 4) Freund's complete adjuvant (FCA)を用いないなど動物に与えるストレスを軽減できる
- 5) 使用動物数削減が可能
- 6) コスト削減が可能
- 7) 着色物質の評価が可能
- 8) モルモットと比較してマウスの免疫系に関する情報が多くある。
- 9) 感作誘導期の評価であるため、将来的にメカニズムの研究や試験法の進歩が期待できる

これらのメリットから、欧米ではLLNAによる感作性試験・研究が広く行われ、データが蓄積され、ICCVAMでの評価を経て、OECDガイドラインとして受け入れられた。EPA, FDA, OSHAも受け入れている。

しかし、リンパ節の細胞増殖反応検出に放射性同位元素(RI)標識化合物のDNAへの取り込みを指標として用いていることや、RIをマウスに尾静脈投与するという手技上の問題があり、わが国での普及が妨げられている。RIを用いない改良法としてBrdUの取り込みやIL-2産生を見る方法が報告されているが、十分にバリデートされていない。

C-2) 申請法について

C-2-1) LLNA-DA法の原理

皮膚感作性は経皮的に取り込まれた低分子化学物質(ハプテン)が生体のタンパクと結合して感作原となることにより起こると考えられている。感作誘導期ではタンパクと結合したハプテンがランゲルハンス細胞に取り込まれ、活性化されたランゲルハンス細胞が所属リンパ節に遊走し、T-リンパ球に抗原提示を行う。抗原提示を受けたT-リンパ球は特異抗原を認識したT-リンパ球として増殖する。

LLNA法はマウス耳介から吸収された被験物質(ハプテン)による抗原特異的なT-リンパ球の増殖を、耳介リンパ節を標的細胞とし、そのリンパ節におけるRI標識化合物の核酸成分への取り込みを指標として検出する方法である。一方、申請されたLLNA-DA法は細胞増殖を検出する指標をATPの検出に変更したものであり、基本的な原理にLLNA法と変わるところは無い

なお、LLNA-DA法はLLNAと同等の検出感度を得るために投与操作および日程に変更を加えている。この変更により感作誘導における原理が両者で異なるか否かについては評価委員会で特に審議した点であり、C-4)に詳述する。

C-2-2) LLNA-DA法のプロトコール

LLNA-DA法のプロトコールを以下に要約する。なお、参考のため、LLNA法の内容を括弧の中に示した。

使用動物：出産経験の無い雌CBN/JN系マウス (同様の雌CBA/CaまたはCBA/J系マウス)

なお、CBA/JNマウスとは、日本チャールズリバーより購入したCBA/JNcrjマウスであり、CBA/Jと基本的に同等のマウスである。

投与群設定：溶媒を用いる陰性対照、陽性対照(10% Eugenol, または15% Hexyl cinnamic aldehyde)、およ

び 3 用量以上の被験物質 (同左、OECD は陽性対照として Hexyl cinnamic aldehyde と Mercaptobenzothiazole を推奨)

群あたり動物数：1 群あたり 3 匹以上 (4 匹以上)

なお、マウスは群飼いとしたが、処置部を他のマウスが傷害したり、被験物質をなめ合うことことは観察されておらず、群飼いが感受性に影響するといった問題は今のところ認識されていない。

溶媒：被験物質が最も良く溶け、あるいは懸濁できる溶媒を用いる。通常 Acetone/Olive oil (4:1, A00), Dimethylformamide (DMF), Methyl ethyl ketone (MEK), Propylene glycol (PG), Dimethylformamide (DMSO) の順に選択する。(同左)

測定指標：ルシフェリン・ルシフェラーゼ法による耳介リンパ節の ATP 含量 (^3H -Methyl-thymidine または ^{125}I -Deoxyuridine を静脈注射し、リンパ球に取り込まれた放射活性)

試験操作：LLNA-DA 法では 3 日間連続で 1% SDS 処置 1 時間後に被験物質溶液あるいは懸濁液をマウスの両耳介に塗布する。7 日目 (または 6 日目) に 4 回目の塗布を行い、その 24 時間後に両耳介リンパ節を取り出し、個体毎に重量を測定したのち、2 枚のスライドガラスにはさんで押しつぶす。それを 0.5 mL の PBS 中に入れ、洗い流す。これを攪拌し、膜組織を避けて 20 μL サンプルングし、PBS 1.98 mL 中に加え、ATP 測定試料とする。

4 回目の塗布により、対照群と処置群との測定値の比 (SI 値) は顕著に増加する。これは抗原特異的な活性型リンパ球またはメモリー細胞が形成され、それらの急速な増殖が生じていることが考えられる。

(被験物質を 3 日間連続処置した後、6 日目に ^3H -Methyl-thymidine あるいは ^{125}I -Deoxyuridine 溶液を尾静脈から注入し、5 時間後にマウスを屠殺する。リンパ節を取り出し、群毎にプールし (個別データが必要な場合は個体別にプールする)、金属性メッシュ上で穏やかに押しつぶし、細胞懸濁液を調製する。これを PBS で 2 回洗浄した後、5% TCA 中で 18 時間静置した後、ペレットを 1 mL の TCA に懸濁し、リンパ球増殖活性を RI の取り込み量を指標として評価する。)

即ち、LLNA-DA 法は 4 回目の処置を行うことが LLNA 法と大きく異なっている。

結果の判定：SI 値が 3 以上の時に、感受性陽性とする。(同左)

C-2-3) LLNA-DA 法の特徴

LLNA 法と比較し、LLNA-DA 法の特徴は以下のように要約される。

- 1) LLNA 法はリンパ細胞増殖の指標として ^3H -Methyl thymidine の取り込みを測定するが、LLNA-DA 法では RI を使用しない方法として、ATP 含量の増加を指標とした。
- 2) LLNA 法は 3 日間連続投与により感受誘導を行い、6 日目のリンパ球増殖を測定するが、LLNA-DA 法は 3 日間連続投与後、7 日目 (または 6 日目) にも 4 回目の投与を行い、その翌日にリンパ球増殖を測定する。
- 3) LLNA-DA 法は投与の際に 1% SLS の前投与を行う。
- 4) リンパ節を摘出し、スライドガラスでつぶすことにより、迅速にリンパ細胞を懸濁できる。
- 5) 10% Eugenol の作用を 9 回の繰り返し実験で検討したが、いずれも SI3 以上の値を示し、再現性がある。
- 6) 感受性物質の識別性は LLNA 法とほぼ同じである。
- 7) RI を静脈内投与しないことから実験操作や廃棄物処理が容易である。
- 8) ATP 含量を高感度かつ迅速な測定法であるルシフェリン・ルシフェラーゼ法で測定することから、結果が速やかに定量的データとして得られる。

C-2-4) 提案書に記載されたバリデーションの種類

提案者の施設で実施された試験で LLNA-DA 法のバリデーションが行われ、再現性や識別性が LLNA 法とほぼ同様と評価されている。また、提案者は生産現場で多くの化学物質について実際に試し、労働安全の立場で、良い結果が得られているとのことである。しかし、いずれも一施設での結果であり、公平な評価を行う上では多施設バリデーションの結果が必要である。

C-3) 申請者の行ったバリデーションの結果について

C-3-1) 被験物質の妥当性

被験物質は 17 種類でその内、モルモット試験で陽性と判定されているものが 14 種類、陰性と判定されているものが 3 種類であった。

被験物質には、クロルベンゼン類 (DNCB: 2,4-Dinitrochlorobenzene)、アミン類 (pPDA: 4-Phenylenediamine)、カルボン酸 (Trimellitic anhydride, Abietic acid)、アルデヒド類 (cinnamic aldehyde, HCA: Hexylcinnamic aldehyde, Citral)、フェノール類 (Isoeugenol, Eugenol)、Urea 類 (Imidazolidinyl urea)、チオール類 (MBT: 2-Mercaptobenzothiazol)、金属 (CoCl_2 , NiSO_4)、殺菌剤 (Propylparaben)、エステル (Methyl salicylate)、界面活性剤 (Benzalkonium chloride) 等、様々な種類の化学物質が含まれてい

た。

感作性の程度に関しては、非常に強い感作性物質である、DENB、pPDA、比較的強い感作性物質として、Cinnamic aldehyde、Isoeugenol を、中程度の感作性物質として、Eugenol および、Abietic acid、Hexylcinnamic aldehyde、Citral、Benzocaine を、また、弱い感作性物質あるいは刺激性物質として、Propylparaben、Methyl salicylate、Benzalkonium chloride が選択されている。なお、LLNA で false negative となる NiSO₄ もリストに加えられている。

以上から、施設内バリデーションでの被験物質の選択はほぼ適切であるが、陰性物質が少なかったことが指摘された。なお、申請法が原法である LLNA 法と原理的に同じと考えた場合には小数の被験物質でも良いが、異なると判定された場合には独立した新規の感作性試験法として、より多くの被験物質で申請法の妥当性を明らかにする必要がある。

C-3-2) In vivo データとの対応性

下の表に示したように、多くの物質について LLNA-DA 法は LLNA と同じ結果が得られた。判定の一致率について κ 係数で比較すると LLNA-DA 法と LLNA 法は 0.667、LLNA-DA 法と GPMT/BA は 0.463、LLNA-DA 法と HMT/HPTA 法は 0.316 であった。なお、ある基準では κ 係数が 0.8 以上では非常に良い一致、0.6 以上では良い一致、0.4 以下ではあまり一致していないとされており、この基準では、LLNA 法との一致は良好であるが、モルモットやヒトでの試験法との一致はあまり良くないと判断される。陰性物質が少なかった事も影響していると考えられることから、今後は陰性物質も増やして追加検討する必要がある。

なお、MBT の結果が陰性であったが、Basketter ら (1992) また、DeJong ら (2002) による LLNA の報告では陽性であり、OECD ガイドライン 429 では、MBT を陽性対照物質として推奨している。しかし、LLNA-DA 法では 10% で SI 値が 2.0 と有意な増加は見られるものの、3 を超えていなかった。それ以上の濃度では逆に SI 値が低下している。LLNA 法と比べ、SI 値が低くなる理由は今のところ不明である。また、LLNA 法と同様に金属塩の検出感度は良くない。

界面活性剤 Benzalkonium chloride は LLNA で陰性、LLNA-DA 法で偽陽性を示した。このため、界面活性剤の中に LLNA-DA 法で偽陽性を示す物質が存在する可能性が考えられた。既に刺激性を有する界面活性剤の中に LLNA 法で偽陽性を示すものが知られており、それらは LLNA-DA 法でも偽陽性となる可能性がある。今後、界面活性剤について LLNA-DA 法を用いて検討する必要があると考えられる。LLNA 法あるいは LLNA-DA 法により刺激性と感作性の識別をどのように可能とするかについては、今後の重要な課題である。

表：17 検体の判定結果のまとめおよび他の試験結果との比較

物質名	LLNA-DA	LLNA	GPMT/BA	HMT	HPTA
2,4-Dinitrochlorobenzene	+	+	+		
4-Phenylenediamine	+	+	+	+	+
Trimellitic anhydride	+	+	+		
Cinnamic aldehyde	+	+	+	+	+
Isoeugenol	+	+	+		+
Eugenol	+	+	+		+
Benzocaine	+	+/-	+	+/-	
Abietic acid	+	+	+		+
Hexylcinnamic aldehyde	+	+	+		
Citral	+	+	+	+	
Imidazolidinyl urea	+	+	+		+
2-Mercaptobenzothiazol	-	+	+	+	+
CoCl ₂	+	+	+	+	+
NiSO ₄	-	-	+	+	+
Propyl paraben	-	-	-	+/-	+
Methyl salicylate	-	-	-	-	
Benzalkonium chloride	+	-	-		+

LLNA: Local lymph node assay, GPMT: Guinea-pig maximization test, BA: Buehler assay, HMT: human maximization test, HPTA: human patch test allergen.

C-3-3) データの信頼性

主たる提案者は皮膚感作性試験について 1997 年より経験がある。また、申請法には技術的に特に困難と思われる所は無い。従って、技術面でデータの信頼性に関する問題は無いと考えられる。また、申請者の属す

る安全性試験施設は GLP 認定施設であり、GLP 試験に準じた試験操作に習熟しているものと思われた。プロトコールは適切に記述されており、施設内バリデーションの結果も適切にまとめられた。個別データの確認も行えた。これらのことから施設内バリデーションは「GLP 精神に準じて、試験が実施された」と見なして良いと考えた。但し、チェックしたデータは 2 次データであり、生データレベルでの確認は行っていない。試薬調製記録の確認も行っていない。従って、多施設バリデーションはコード化された被験物質をもちいて行い、データの信頼性を更に確認する必要がある。

C-3-4) 施設内再現性

Isoeugenol について、9 回の繰り返し実験を行っていた。その結果によれば、リンパ節重量の対照群との比 (SI 値) に大きな差は無く、また、その ATP 含量の SI 値は若干ばらついてはいたが、陽性物質の基準である SI 値 3 を超えていた。また、SI 値 3 を示す推定濃度 (EC3) も 3 回の繰り返し実験で 3.40%、2.28%、2.46% であった。以上より、申請法の陽性と陰性との識別における再現性は良いと判断される。

Eugenol (10%) について、9 回の繰り返し実験を行っていた。その結果によれば、リンパ節重量の対照群との比 (SI 値) に大きな差は無く、また、その ATP 含量の SI 値は若干ばらついてはいたが、陽性物質の基準である SI 値 3 を超えていた。また、SI 値 3 を示す推定濃度 (EC3) も 3 回の繰り返し実験で Eugenol では 5.09%、5.59%、4.23%、Isoeugenol では 3.40%、2.28%、2.46% と大きな差は無かった。以上より、申請法の陽性と陰性との識別における再現性は良いと判断される。

C-3-5) 施設間再現性

多施設でのバリデーションが実施されていないことから、判断できなかった。

C-3-6) 比較対照とした in vivo データの妥当性

Haneke ら (2001) や Basketter ら (1992) の適切な論文に掲載されたマウス、モルモット及びヒトでの実験結果と比較している。

C-3-7) 試験法の頑健性

マウスは系統によって感作性物質に対する反応が異なることから、適切な系統のマウスを用いるとともに、頻繁に陽性対照を用いて試験を実施し、その反応性を確認する必要がある。また、ATP 含量測定に用いる試薬はメーカーにより発光度や減衰が異なることから、予試験で定められた適切なプロトコールに厳密に従って実施する必要がある。

C-3-8) 動物福祉面からの妥当性

申請法は in vivo 試験法であり、完全な代替試験法ではない。しかし、LLNA 法と同様に FCA 処置を行わず、動物に与えるストレスが少ない。また、LLNA と異なり尾静脈注射の段階が無く、動物の拘束や苦痛が少ない。また、使用動物数は Maximization 法などの従来法では 1 群 5 匹以上が要求されているが、申請法では 3 匹以上と少ない。これらのことから、申請法は従来法より動物福祉の面で優れていると考えられる。

C-3-9) コストからの妥当性

コストの面については詳しい積算は示されていないが、特にコストパフォーマンスが悪いとは思われない。LLNA 法は RI 施設とシンチレーションカウンターという高価な機器が必要であるが、本法では RI 施設は必要なく、用いる ATP 測定装置は相対的に安価である。

C-3-10) その他の面からの考察

RI 標識化合物を用いないこと、また、廃棄物処理の手間がかからないという利点があることから、広く日本の安全性試験で利用されることが期待される。

LLNA 法は Maximization 法で実施できる交差反応性の検討を行うことができないという欠点があるが、LLNA-DA 法も同様である。

C-4) 評価委員会で特に審議した問題点

C-4-1) LLNA-DA 法の位置づけについて

LLNA-DA 法は感作性試験の代替法としてではなく、LLNA 法の代替法として提案されたため、LLNA 法との原理面から見た同等性について懸念があった。そのため、LLNA-DA 法の 4 回目の投与によりリンパ球のサブクラス (T 細胞および B 細胞) がどの程度変化するかを調べ、両者の感作誘導法の質的な違いを検討した。その結果、いずれの被験物質においてもリンパ球の増殖が起こる中で B 細胞の増殖が起こり、それに伴って B

細胞の比率の増加が認められた。したがって、LLNA-DA 法と LLNA 法の感作誘導における差は主としてどれだけリンパ球を増殖させたかという違いで質的な差は少なく、原理的に見て LLNA-DA 法は LLNA 法の延長上と考えると良いと結論した。ただし、リンパ球の増殖における量的な違いは認められるので、LLNA 法との同等性についてはバリデーションでさらに検証していく必要があると考えられる。

C-4-2) LLNA-DA 法のプロトコールの問題点について

LLNA-DA 法のプロトコールの問題点について検討した結果を以下に示す。

1) 被験物質の 4 回目処置について

LLNA 法は被験物質を連続 3 日間処置するのに対し、LLNA-DA 法は 6 日目または 7 日目に 4 回目の処置を行う。このため感作誘導期の反応を捉えるとされている LLNA 法とは異なり、感作誘導期だけでなく誘発期の反応も加わってしまうことが懸念された。これについては以下のような意見があったが、最終的にエンドポイントとしている耳介局所のリンパ節に起こっている現象だけを捉えた場合、従来の LLNA 法と差がないという結論に至った。

感作誘発期の反応の影響は少ないとする意見：

- ①申請者の実験によると 4 回目の塗布において耳介に外見的に大きな変化は認められず、耳の反対側に Challenge したとき、免疫応答ができるのは 10 日目位からである。したがって、4 回目の塗布を行う時点では感作誘発期の反応の関与は少ないと考えられる。
- ②LLNA-DA 法を用いて 4 回目の投与後のリンパ球サブクラス (T 細胞および B 細胞) 解析を行ったところ、LLNA-DA 法と LLNA 法の感作誘導で質的な差が少なかった。

感作誘発期の反応も加わっているとする意見：

- ①4 回目の塗布時に「惹起」というような反応が起こりうるか否かは被験物質の種類及び濃度によると考えられる。感作誘導期の反応の影響が現れないとは言いきれない。
- ②DNCB のように強い感作性物質では比較的早期に感作が成立して、LLNA-DA 法の 4 回目の投与の時点では惹起過程にあると推測している。リンパ球のサブクラス (T 細胞および B 細胞) 解析のデータで DNCB における B 細胞が若干高いのは惹起反応であるかもしれない。

また、もし 4 回目の処置により B 細胞の増殖が過剰になると体液性免疫を検出する試験法であるマウス膝窩リンパ節試験 (PLNA) との差がなくなり、細胞性免疫を検出する試験法としての位置づけが変わる懸念が指摘されたが、リンパ球のサブクラス (T 細胞および B 細胞) 解析において LLNA 法と LLNA-DA 法で質的な差は少なく、B 細胞の過剰な増殖も認められなかったため、問題ないと結論した。

2) ATP 含量を細胞増殖の指標とした点について

ATP はリンパ節中の非増殖細胞中にも含まれており、ATP 含量の変化は必ずしも細胞増殖に平行しているものではない。また、周囲組織の ATP も一部測定されてしまう可能性もあるが、スライドグラス上での塗末によりリンパ細胞がうまく分散し、周囲組織を避けて採取できることから、その関与は少ないと考えられる。実際、申請法のプロトコールにより LLNA 法とほぼ同等の被験物質濃度で同様の SI 値が得られている。

3) Sodium lauryl sulfate (SLS) 処置について

LLNA-DA 法は LLNA 法と異なり、1% SLS 溶液での前処理を行っている。SLS は LLNA 法で偽陽性となる。LLNA-DA でも同様に偽陽性であった。また、SLS が被験物質の反応に影響を与える可能性も考えられる。SLS の処置は被験物質の感作性評価において問題とならないかとの指摘があった。しかし、LLNA で反応が起こるのは、より高濃度の SLS で処置した場合であり、LLNA-DA 法では反応の起きない濃度を用いている。また、感作性を持たない被験物質が、1% SLS による僅かな細胞増殖活性が影響を与え、結果として偽陽性となるようなケースについての知見はない。一方、SLS でランゲルハンス細胞の遊走が増加するとされており、1% SLS の影響は Eugenol, Isoeugenol 及び HCA で約 20% の SI 値の増加が認められている。これは LLNA-DA 法の感度上昇に役立っており、結果として、LLNA と同様の SI 値と EC3 値が得られた。また、感作性物質の識別能も LLNA とほぼ同様であった。

なお、SLS はもともと水溶性の被験物質に適用するために用いられたものである。脂溶性の被験物質に用いることの意義に疑問があるとも指摘された。SI 値の閾値を下げることにより、SLS を使用しなくとも良いかも知れないとの指摘もあった。しかし、識別値を変えるとその値の妥当性の検討のために大きな追加実験を行わなくてはならなくなることから、実施困難であるし、今回の評価委員会の審議の範囲を超えるものであると考えられた。また、行政上は偽陰性を恐れることから、SLS 使用により多少偽陽性が増えても、それで試験法の感度が上がり、偽陰性が低下するのであれば、処置の意味はあると考えられた。

4) 使用動物数について

使用動物数は LLNA 法では 4 匹以上であるが、申請法では 3 匹以上としている。ATP 含量のバラツキが大きい 1 群 3 匹で十分であるか検討した。申請者は ATP 発光量のばらつきは、実験操作や ATP 測定法に起因するのではなく、リンパ節中の細胞数の実際のばらつき、即ち、試験における動物の個体差を反映したものであると考えている。個体差を生じる原因は、動物自身の感受性の差、さらには被検物質を耳介に塗布すると言う実験操作に由来すると思われる。動物数は 4 匹以上がベターであろうが、3 用量をとっていることから、3 匹でも実用上の問題は起きていない。動物数を削減する意味からも、増やす事は好ましくないと考えた。しかし、3 匹で充分であることを示すには、3 例で原法同様の精度 (バラツキ) である事を示す必要がある。LLNA 法での 4 匹と、LLNA-DA 法での 3 匹とで EC3 値の点推定値と信頼区間が同程度であれば、3 匹でも良いということになるが、今回の評価期間中にそれを示すのは困難であった。このように、LLNA の代替法とするならば例数を減らしてもよいという根拠を示す必要があるが、それを示すのは困難であることから、バリデーションの際は 4 匹以上を用いるのが良いとされた。

5) 対照物質について

LLNA 法では陽性対照として HCA を使用しているが、LLNA-DA 法では Eugenol を使用している理由について申請者に問い合わせたところ次のような回答がなされた。

- ① OECD ガイドライン 429 では、HCA または Mercaptobenzothiazol を陽性対照物質として推奨し、SI が 3 を超え、かつ SI が大きくなり過ぎない用量で用いる事としている。但し、十分な根拠があれば、同等の感作性ランクの陽性対照物質を用いる事も可能とされている。
- ② 当初 Eugenol を使用して検討を行ってきた経緯から、Eugenol の蓄積データが最も豊富であったため、陽性対照物質として採用した (10% 用量では、 $SI=4.99 \pm 1.35$ ($n=18$)) が、現在は HCA の蓄積データが揃ってきたため、HCA を陽性対照物質としている。15% 用量で $SI=4.08 \pm 0.91$ ($n=13$) である。このように、HCA は安定性に優れていると報告されているため、陽性対照物質としてはより望ましいと考えられる。
- ③ 陽性対照の反応は溶媒が同じで有る限り、大きな差が出たことは無い。

また、陽性対照はヒトに与える影響が大きいので、陽性対照を用いた試験の頻度が少なくても良いのではないかとの意見が出た。また、当面は LLNA 法で使用されており、バリデーションに際しては、安定したデータの得られる HCA を陽性対照として用いるのが良いだろうとされた。

C-4-3) プロトコールは詳細かつ適切に書かれているか

プロトコールは詳細に記載されており、下に示した一部を除き問題無いと思われた。

1) SLS 塗布法について

SLS の塗布法が具体性に欠けるとの指摘に応じ、具体的な方法が示された。なお、ピペットマンを使用し一定量を投与することも不可能ではないが、水溶液であるため耳介表面になじみにくく、全体に均一に塗布するのが困難である。また塗布に時間を要する。これらのことを考慮し、LLNA-DA 法では筆による塗布を採用した。

2) ATP 測定法について

ATP 測定に影響する被験物質はないかとの質問があった。これに対し、1) 細胞懸濁液を 100 倍希釈して用いることから、通常、残留した被験物質が直接発光に影響することは考えられない。しかし、2) ATP 合成を促進する薬物や阻害する薬物の場合は ATP 含量に影響するが、これらの場合はリンパ節重量に影響しないことから、それと合わせて評価することにより、判定できる、と回答された。

ATP 測定までの時間による影響や試薬のロット差について質問された。これに対し、ATP 測定の直線性、試薬差、ロット差、発光の時間経過、ATP の安定性に関するデータが示された。また、ATP 測定試薬は CAMBREX 社 (LumiTech™Vialight™) と KIKKOMAN 社 (ルシフェール 250 プラス) が使用可能である。発光量や減衰性はキット間やロット間で差がある。即ち、KIKKOMAN 社の方が発光量が 10 倍位多いが、発光の減衰が早い。CAMBREX 社の製品では 1%/min 位の早さで減衰する。

具体的には、リンパ節摘出後 ATP 含量は経時的に低下することから、リンパ節摘出から発光測定までの操作は、概ね 20 分以内で終え、かつ、個体ごとの経過時間をできるだけ揃える事が望ましい。また、酵素 (AMR) 添加後は、発光量が急速に減少することから、酵素添加後はできるだけ時間を置かず測定することが望ましい。測定は 1 サンプルずつ、酵素添加後直ちに行うとすれば、操作自体は数秒以内終わるため、実際上問題はない。また、100 倍希釈懸濁液をドライアイス/メタノール中で凍結させることにより ATP の低下が抑制される。KIKKOMAN 社の試薬では数秒で測定が終了するが、CAMBREX 社の試薬では約 5 分かかる。グループで作業する場合は CAMBREX 社の試薬が便利だが、一人で作業する場合は KIKKOMAN 社の試薬が使用しやすい。

C-4-4) 感作性強度の分類基準について

今回申請書本文には、感作性陽性物質の強度に関する判定基準は記載されていない。記載された感作性強度区分は、既報の GPMT による感作性強度区分とヒトの感作性強度区分に基づくものであり、LLNA-DA 法の EC3 による感作性強度区分ではない。近年、LLNA 法の EC3 に基づく感作性強度区分が提案されており、それによると、EC3 が 0.1%未満のものを Extreme、 $0.1\% \leq EC3 < 1\%$ を Strong、 $1\% \leq EC3 < 10\%$ を Moderate、 $10\% \leq EC3 \leq 100\%$ を Weak としている (Kimber et al 2003, Gerberick et al 2004)。この基準に従って、LLNA-DA 法で評価した感作性物質の強度区分と LLNA 法による既報の強度区分とを比較すると、両者はほとんど同じ分類になる。2-Mercaptobenzothiazol が偽陰性であることを除くと、一致しているかまたは Moderate と Weak 間の 1 区分の相違である。

C-4-5) 刺激性物質と感作性物質の識別について

Gerberick らは B220 細胞は感作性物質で増加し、刺激性物質では増加しないことを見出し、これを指標にして刺激性物質と感作性物質が区別できると報告している。今回のリンパ球サブクラス解析データは刺激性物質の SLS により B220 細胞が増加しており、Gerberick らと反対の結論になる。この違いに関して申請者は今回のデータでは SLS の用量が 10%であるのに対し、Gerberick の実験は 20% SLS で実施されており、SLS の毒性により B220 細胞が増加しなかった可能性がある。また、刺激の強いものでは用量反応関係が崩れることがある。Gerberick らの論文の結論と食い違っているが、SLS で B 細胞が増加すると考えざるをえない、としている。一方、内部データではあるが、15% SLS で B 細胞は増えていたとも報告された。B220 細胞の変化で刺激性物質と感作性物質は区別できないと思われる

C- 5) 特許の状況

多くの方々に使用してもらうよう、特許出願していない。

D. 現時点での総合評価

- 1) 評価委員会では LLNA-DA 法が C-2-3) で示したような特徴を有し、日本で使用しにくい RI 標識化合物を用いない方法であること、また、簡便かつ迅速に結果が得られるにも関わらず、原法である LLNA とほぼ同等の結果が得られていることから、LLNA 法に置き換わりうる方法であると判断し、多施設バリデーションでより詳細なデータを得た上で更に評価する必要があると考えた。
- 2) LLNA-DA 法は、LLNA 法より主としてエンドポイント並びに投与操作、日程を変更しているが、エンドポイントの原理、リンパ球サブクラス (T 細胞および B 細胞) の解析結果及び得られた SI 値から見て、LLNA 法と原理的に異なる試験ではないと考えられる。ただし、ATP 含量の変化は必ずしも細胞増殖に平行していないことに由来する微妙なエンドポイントの違い、並びに感作誘導時のリンパ球の増殖における量的な違いなどが認められるので、LLNA 法との同等性についてはバリデーションでさらに検証していく必要があると考えられる。
- 3) LLNA 法と同様に金属類への感度が低い。また、刺激性を有する界面活性剤で偽陽性を出現させる可能性がある。
- 4) 詳細なプロトコールが用意されている。また、今回の評価委員会の指摘を踏まえ、微細な修正が行われる予定である。
- 5) 結果の判定方法の妥当性については、SI 値 3 が識別値になるように、SLS 前処置を加えてある。その必要性については議論があったが、特に、感作性試験法として不適切とは言えない。
- 6) ATP 測定を決められた時間内に正確に行わなければならないが、その他の点については、比較的容易に実行できるものと思われる。

E. 今後行われる多施設バリデーションのあり方について

以下のように考えられた。

- 1) Core laboratory はダイセル化学に努めてもらい、プロトコールを作成してもらう。また、技術トランスファーを実施してもらう。
- 2) バリデーションに協力してもらう機関は LLNA 法を行ったことがあり、ATP 測定装置を有する機関とするのが良い。
- 3) 試験期間を 1 月程度としたとき、1 機関で実施可能な被験物質数はプロトコールの内容によって異なるが、陽性対照、陰性対照、被験物質 2 個 (1 用量) を 1 セットとした場合、1 週間で実施可能であることから、これを 3 回繰り返すとして、6 検体まで可能であろう。
- 4) 1 群当りの動物数は LLNA-DA 法では 3 匹であるが、LLNA-DA 法は LLNA 法よりも動物数を減らす事を主眼とした代替法ではないこと、また、3 匹では 1 匹分のデータが使用不能になった場合に解釈が困難になることから、LLNA 法に準じて 4 匹が良い。
- 5) 用量段階は、公比 10、3 用量で行うのが良い。

- 6) 被験物質候補リストはダイセル化学工業(株)の協力を得て作成する。
- 7) 初めはバイアスがなるべく少なくなるように、条件を揃えて実施するのが良い。

F. 引用文献

- Basketter DA, Scholes EW. Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. *Fd Chem Toxicol.* 30, 65-69, 1992.
- Basketter DA, Gerberick GF, Kimber I, Loveless SE. The local lymph node assay: a viable alternative to currently accepted skin sensitization tests. *Food Chem Toxicol.* 34, 985-97, 1996.
- De Jong WH, Tentij M, Spiekstra SW, Vandebriel RJ, Van Loveren H. Determination of the sensitising activity of the rubber contact sensitizers TMTD, ZDMC, MBT and DEA in a modified local lymph node assay and the effect of sodium dodecyl sulfate pretreatment on local lymph node responses. *Toxicology.* 176, 123-134, 2002.
- Haneke KE, Tice RR, Carson BL, Margolin BH, Stokes WS. ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. Data analyses completed by the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 274-286, 2001.
- Gerberick GF, Cruse LW, Miller CM, Sikorski EE, Ridder GM. Selective modulation of T cell memory markers CD62L and CD44 on murine draining lymph node cells following allergen and irritant treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 146, 1-10, 1997.
- Gerberick GF, Ryan CA, Kern PS, Dearman RJ, Kimber I, Patlewicz GY, Basketter DA. A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis.* 50, 274-288, 2004.
- Kimber I, Mitchell JA, Griffin AC. Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. *Food Chem Toxicol.* 24, 585-586, 1986.
- Kimber I, Basketter DA, Butler M, Gamer A, Garrigue JL, Gerberick GF, Newsome C, Steiling W, Vohr HW. Classification of contact allergens according to potency: proposals. *Food Chem Toxicol.* 41, 1799-1809, 2003.
- OECD: OECD guideline 429 Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, (adopted 24th April 2002)
- Takeyoshi M, Sawaki M, Yamasaki K, Kimber I. Assessment of statistic analysis in non-radioisotopic local lymph node assay (non-RI-LLNA) with alpha-hexylcinnamic aldehyde as an example. *Toxicology.* 191, 259-63, 2003.

以上

厚生労働科学研究費補助金（医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス研究事業）
分担研究報告書

代謝活性化能を含む細胞の開発

分担研究者 小澤正吾 国立医薬品食品衛生研究所、薬理部第三室長

研究要旨

ヒト皮膚に発現が認められる CYP1A1 に機能が類似している CYP1A2 が組み込まれた細胞系を用いてヘテロサイクリックアミン 2 種を被験物質として代謝活性化による殺細胞作用を指標にして検討した。皮膚腐食性の代替法の系として、殺細胞作用を指標にすることについては検討の余地があると思われた。代謝活性化系を組み込んだ細胞と、細胞毒性を観察する細胞とを共培養する系を次年度以降開発していく。

A. 研究目的

皮膚腐食性試験や皮膚感作性試験の *in vitro* 代替法は皮膚ケラチノサイト、皮膚三次元モデル、ヒト免疫系細胞を用いて開発が行なわれている。これらの系で大きな問題点の一つは、皮膚のいわゆる薬物代謝酵素による代謝活性化経路が組み込まれていないため、皮膚に対する有害事象の発現に代謝活性化を要する場合は、*in vitro* 代替法試験を用いると false negative になる可能性がある被験物質がありうることである。本研究では、ヒトケラチノサイト等を用いて開発中の皮膚腐食性や皮膚感作性試験の *in vitro* 代替法に、薬物代謝酵素による代謝活性化能を組み込んだ系の開発の基盤的研究を遂行することを目的とする。

B. 研究方法

B-1) 皮膚細胞に発現している薬物代謝酵素分子種の同定

成人表皮ケラチノサイト、皮膚繊維芽細胞、胎児表皮メラノサイト、を

BioWhittaker 社から購入した。皮膚ランゲルハンス細胞はヒト CD34+ を発現している幹細胞から作成したが、CD34 が確実に発現していることをフローサイトメトリーで確認した。各細胞から総 RNA を抽出し、CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2A7, CYP2B6, CYP2C, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP4B1 の相対発現レベルを測定した。

B-2) 皮膚に発現している薬物代謝酵素分子種をコードする cDNA の単離

前項の方法で皮膚での発現が認められた CYP 分子種につき、cDNA を Genecopoeia 社から購入、または、全長を増幅可能なプライマーで増幅し、哺乳動物発現ベクター pCR3.1 に組み込んだ。

B-3) シトクロム P450 の一分子種 CYP1A2、およびアリルアミン N-アセチル転移酵素 NAT2 を組み込んだチャイニーズハムスター細胞による生体外異物の代謝活性化

シトクロム P450 の一分子種、

CYP1A2、およびアリルアミン N-アセチル転移酵素 NAT2 の両方を組み込んだチャイニーズハムスター卵巣由来細胞 CHO を Dr. J. S. Felton (Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore CA) から供与いただいたものを用いた。これら細胞に種々の被験物質を 37°C、24 時間作用させ、その細胞死をコロニー形成率が 37% に減じる被験物質の濃度をもって被験物質の毒性の強度とした。

C. 研究結果

C-1) 皮膚細胞に発現している薬物代謝酵素分子種の同定

測定項目のヒト CYP 分子種について発現が認められたものにつき、以下、細胞別に列挙する。

ヒト初代ランゲルハンス細胞 : CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A5, CYP3A7

ヒトケラチノサイト : CYP1A1, CYP1B1, CYP2C, CYP2E1, CYP3A5, CYP4B1

ヒト繊維芽細胞 : CYP1A1, CYP1B1, CYP2A6, CYP2C, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A5, CYP3A7

ヒトメラノサイト : CYP1A1, CYP1B1, CYP2A6, CYP2E1

C-2) 皮膚に発現している薬物代謝酵素分子種をコードする cDNA の単離

上記のうち、CYP2A6, CYP2A6, CYP2E1, CYP3A5, CYP4B1 はヒト肝にも発現が認められていることが知られているのでヒト肝 polyA+RNA (Clontech) を購入し、Reverse transcriptase-PCR 法で全長

cDNA を単離した。その他の CYP1B1, CYP2C (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19)、CYP2D6 は Genecopoeia 社から購入した。これらについては、塩基配列の確認の上、使用する予定である。

C-3) シトクロム P450 の一分子種 CYP1A2、およびアリルアミン N-アセチル転移酵素 NAT2 を組み込んだチャイニーズハムスター細胞による生体外異物の代謝活性化

今回、CYP1A2 単独、および CYP1A2+NAT2 の細胞について、ヘテロサイクリックアミンの障害性を比較した。図 1 に結果を示すとおり、IQ については NAT2 の影響が出ているが、NAT2 をさらに組み込んでも細胞毒性が強くなるはなかった。それに対し、PhIP については NAT2 を発現した細胞で、CYP1A2 単独より細胞毒性が強く発現した。このことより、これらヘテロサイクリックアミンについては、細胞障害性が代謝活性化酵素の導入により確認された。

C-4) 皮膚障害性の検出方法に関する調査結果

2004 年、Weiss らにより、Welss T. et al., *In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. Toxicology in Vitro* 18, 231-243 (2004) という総説が出された。一部を抜粋して表 1 に示す。それによると IL-1 α が被験物質の細胞障害性と共に漏出することが認められているが、IL-1 α の転写活性の上昇も同時におけるとされている。細胞遊走因子 IL-8 等の遺伝子発現の亢進が起こることも報告されている。細胞障害性と平衡して起こる遺伝子発現亢進を指標と

することも視野に入れると新規な試験系の開発につながると思われる。

さらに、Corsi 氏らにより (Corsi E. et al., Use of differential display-PCR to identify genes selectively modulated by chemical allergens in reconstituted human epidermis. *Toxicology in Vitro* 16, 427-431 (2002))、ヒト表皮再構成系を用いて接触感作物質を IL-12 や Adipose differentiation-related protein (ADRP) の転写活性化がおこるといふ報告が出された。しかし、この系には、関与すべき免疫系が含まれているとは思えず、検討の余地があると考えられる。

D. 考察

今回、ヒト皮膚に発現が認められると考えられるシトクロム P450 分子種の発現をヒト皮膚各種初代培養細胞を用いて調べた。また、ヒト皮膚に発現が認められる CYP1A1 に機能が非常に類似しているが、主に肝に発現している CYP1A2 が組み込まれた細胞系を用いてヘテロサイクリックアミン 2 種を被験物質として代謝活性化による殺細胞作用を指標にして検討した。皮膚腐食性の代替法の系として、殺細胞作用を指標にすることについては検討の余地があると思われる。実際、2004 年に相次いで、皮膚腐食性や接触感作物質を見出す系が報告されており、報告者が開発しようとしている細胞系の被験物質による作用をどのような指標で見るかについては大変重要な問題であると考えられる。今年度の殺細胞作用を指標とした細胞系、および in vitro ヒト皮膚腐食性試験の代替法として試みられている系の情報を総合すると、図 2 のよう

に、代謝活性化系を組み込んだ細胞と、細胞毒性を観察する細胞とを共培養する系が有望ではないかと考えられた。次年度にはその点について種々の毒性指標を試していく考えをもっている。

E. 結論

種々の毒性物質をヒト代謝活性化を組み込んだ細胞系を開発し、皮膚腐食性試験や皮膚感作物質の試験系に結びつけることを究極の目的として、第一段階として、ヒト CYP1A2 を導入した細胞系をヘテロサイクリックアミンを被験物質として殺細胞作用を指標として試験した。ヒト皮膚腐食試験やヒト皮膚感作物質の試験系としては、考慮すべき点が多いが、種々の問題点を克服しながら、in vivo に代替する試験法へ近づけていきたいと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1) 論文発表

K. Toda, S. Ishida, K. Nakata, R. Matsuda, S. Ozawa, J. Sawada, Y. Ohno, K. Inoue, K. Shudo and Y. Hayashi: Improvement in reliability of probabilistic test of significant differences in GeneChip experiments. *Anal. Sci.*, 20, 731-733, 2004.

G-2) 学会発表

宮島 敦子, 小澤 正吾, 何 晋徳, 田中 宏昌, 仲井 健也, 篠内 桃子, 上川 雄一郎, 窪田 敬一, 緒方 宏泰, 大野 泰雄
ヒト肝における CYP1A, 2B, 2C, 3A 遺伝子

および関連核内受容体遺伝子の発現量
の個体差

日本薬学会第 125 年会（横浜）2005 年 3 月

H. 知的所有権の取得状況

なし

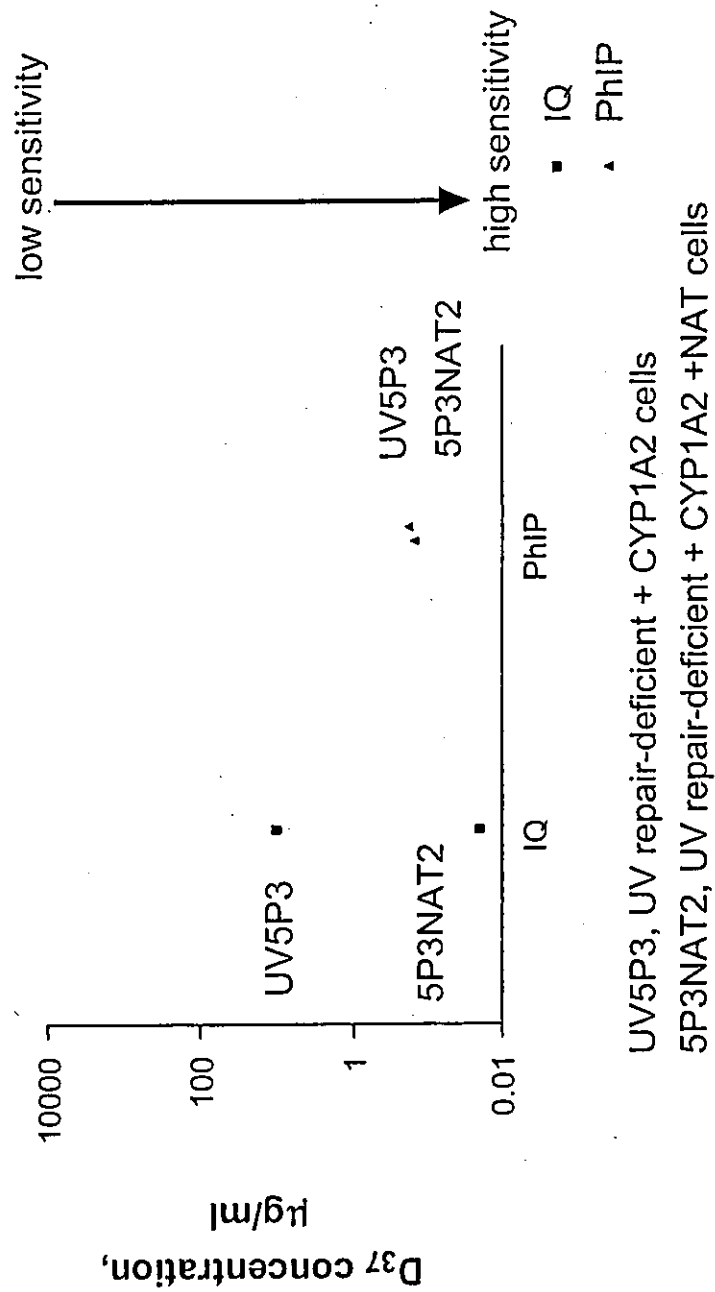


図1. PhIP および IQ による代謝活性化系 (CYP1A2, NAT2) を組み込んだCHO細胞に対する殺細胞作用

Models	Substrates	Viability or cytotox.	Released cytokines	Refs.
EpiDerm	10 irritants	+ (MTT, LDH)	No description	Fentem et al., 2001
	10 non-irritants	-		
	13 surfactants	+ (AlamarBlue)	IL-1 α ^a , IL-1RA, IL-6, IL-8	Bernhofer et al., 1999
Episkin	10 irritants	+ (MTT)	IL-1 α	Fentem et al., 2001
	10 non-irritants	-		
HSE	7 irritants (BA, BC)	+ (MTT)	IL-1 α , PGE ₂	Gay et al., 1992
	SDS	+ (LDH)	IL-1 α , IL-6, PGE ₂	Ponac & Kempenaar, 1995
	SDS	+	IL-1 α ^a , IL-8	Medina et al., 2000
Apigrif	trans-retinoid acid	+	IL-1 α ^a , IL-8	Medina et al., 2000

^aDifferential gene expression by RT-PCR; BA, benzoic acid; BC, benzalkonium chloride

From a review article, Welss T. et al., In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. Toxicology in Vitro 18, 231-243 (2004)

表1. 種々のin vitro 皮膚腐食性試験系:用いられたヒト皮膚再構成系、被験物質と皮膚障害性評価の指標

1. 代謝活性化能を有する細胞系を樹立する。
 - 一過性発現系
 - 安定的発現系
2. 上記の細胞系を用いてCo-culture系の構築を行なう。

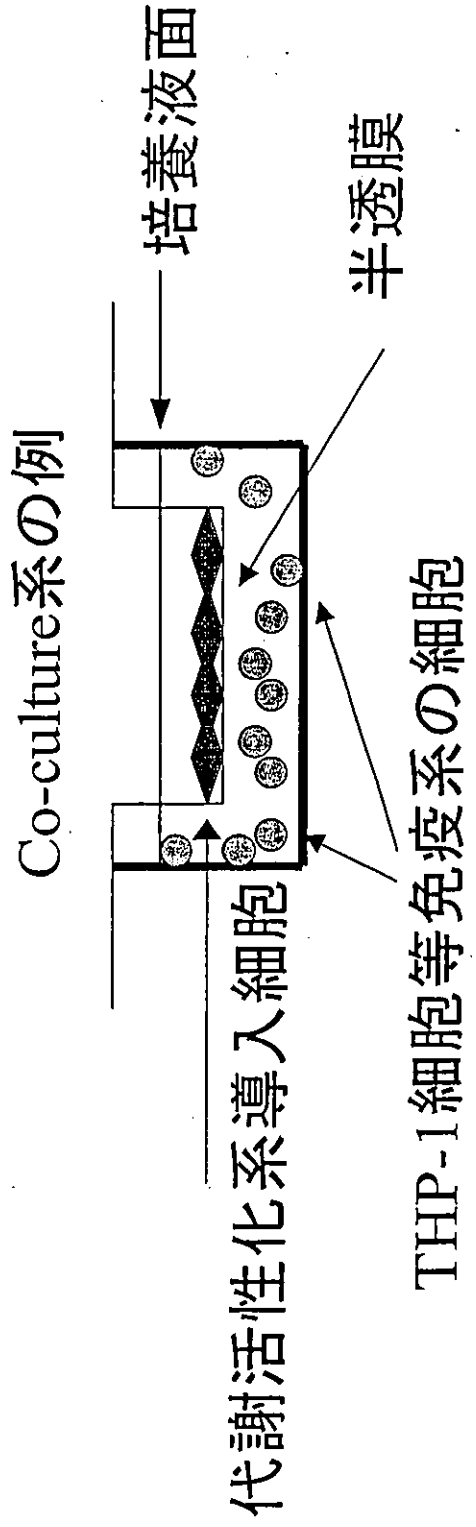


図2. 来年度に構築を目標とする代謝活性化系導入細胞を用いた皮膚腐食性試験動物代替評価系

光感作性試験代替法開発に関する研究

分担研究者 戸倉 新樹（産業医科大学医学部皮膚科、教授）

研究要旨

*In vitro*での光アレルギー性試験として、被験物質のアポトーシス誘導能により光感作能を予見する代替法を確立することを試みた。まず、UVB誘導性ヒト表皮角化細胞のアポトーシスをフローサイトメトリー法で解析する方法を確立した。次に光感作性物質の一つであるTCSAを用いてTCSA光修飾表皮細胞を作製し、UVAを照射した後のアポトーシスとネクローシスの割合を検討した。フローサイトメトリーを用いたUVB誘導性アポトーシス、ネクローシスの解析では非常に簡便でかつ鋭敏に測定できることがわかった。 10^{-5} Mの濃度で作製したTCSA光修飾表皮細胞にUVA 4 J/cm^2 照射することで、40%のネクローシスと20%のアポトーシスを確認できた。光アレルギーを生じる光感作性物質で代表的なTCSAにおいて、その光修飾表皮細胞にUVAを照射した場合、若干のアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。

A. 研究目的

一般に光感受性物質による反応は光毒性と光アレルギー性に分けられる。光アレルギー反応は当該物質が皮膚に塗布され、あるいは経口的に摂取され、皮膚に光が当たって生ずる。この光感作反応は多くの免疫担当細胞の関わり、その連鎖の結果として起こる。ほとんどの光感作性物質は、光ハプテンとしての性格を持ち、UV照射がなされるとその化学構造の一部が光分解され、その分解と同時に近傍の蛋白と共有結合し完全抗原ができあがる。我々は液体クロマトグラフィを用いてこの光共有結合を検討してき

た。本研究は、この感作性を *in vitro* の反応で検出することを目的とする。

被験物質の溶液中に浮遊させたヒト表皮角化細胞（ケラチノサイト）にUVAを照射し、同物質がケラチノサイトのアポトーシスとネクローシスを誘導する割合を検討する。アポトーシス誘導性物質は、修飾細胞が抗原提示細胞に取り込まれ易くするため、光感作能を占うことができる。つまり本研究では被験物質のアポトーシス誘導能により光感作能を予見することを試みるものである。

B. 研究方法

B-1) ヒト表皮角化細胞におけるアポトーシス、ネクローシス解析法の確立

UVB はヒト表皮角化細胞に対して、容量、時間依存的にアポトーシスを誘導する。従って、まず、UVB 誘導性のヒト表皮角化細胞のアポトーシスをフローサイトメトリー法で解析する方法を確立する。ヒト表皮角化細胞はセルラインである HaCaT 細胞を用いた。紫外線照射装置は、Broadband-UVB 照射装置と Narrowband-UVB 照射装置の 2 種類を使用した。上記 2 種類の UVB をディッシュに 80 % セミコンフルエントに培養した HaCaT 細胞に対して照射後、6、12、24 時間 CO₂ インキュベーター内で培養し、フローサイトメトリーでアポトーシス、ネクローシスを解析した。

フローサイトメトリーによるアポトーシス、ネクローシスの同定には FITC-Annexin V と 7-AAD を使用した。アポトーシスを生じた細胞では、細胞質内に発現しているフォスファチジルセリンが細胞外の細胞膜に発現する。このフォスファチジルセリンに FITC で蛍光標識した Annexin V と特異的に接着させ、その発現量を測定した。一方、ネクローシスを生じた細胞は細胞膜の透過性が亢進しており、そこに核染色剤である 7-AAD を投与することで核染色を行った。これら、Annexin V と 7-AAD の 2 重染色を行い、Annexin V、7-AAD のどちらにも染色されない細胞集団を生細胞群、Annexin V のみ陽性である細胞集団をアポトーシス細胞群、

それ以外を死細胞群として、% 表示した。

B-2) TCSA による光修飾表皮細胞の確認

ディッシュに 80 % セミコンフルエントに培養した HaCaT 細胞に対して各濃度勾配の TCSA 含 PBS で 1 時間 CO₂ インキュベーター内で培養し、UVA を 4 J/cm² 照射。その後、TCSA 含 PBS を除き、PBS で 3 回洗浄後、同物質が HaCaT 細胞の細胞膜、細胞質の蛋白に共有結合し、光修飾表皮細胞となっているかを蛍光顕微鏡下に観察した。

B-3) TCSA 光修飾表皮細胞のアポトーシス、ネクローシス解析

B-2) で作製した TCSA 光修飾表皮細胞を培養液で 24 時間 CO₂ インキュベーター内で培養し、B-1) の方法を用いて、アポトーシス、ネクローシスの割合を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、培養細胞を用いた *in vitro* の研究のため、倫理面では特に問題になることはなかった。

C. 研究結果

C-1) UVB 誘導性ヒト表皮角化細胞におけるアポトーシス、ネクローシス解析

Broadband-UVB を 0, 30, 60, 100 mJ/cm² 照射、および Narrowband-UVB を 0, 300, 600, 1000 mJ/cm² 照射した後の 6, 12, 24 時間後の