

第6章 その他の情報

6-1) 試験法の頑健性および容易性

施設間および施設内再現性が高い日本で得られた結果¹⁾と欧州で実施された EpiDerm™ の結果はよく類似しており²⁾、プロトコールに従っている限り試験結果は大きな変動を受けず、EpiDerm™ は頑健なものであると判断する。また、習得に要する時間も短く、技術的に容易な移転が可能な方法であると思われる。

6-2) 動物福祉面からの妥当性

いずれの皮膚モデルも動物試験をまったく実施しておらず、動物福祉面からの代替法として妥当である。

6-3) 他の方法の紹介と比較

現在、OECD の *in vitro* 皮膚腐食性試験ガイドラインとして、二つの試験法が承認されている。一つは、OECD ガイドライン 430「摘出皮膚電気抵抗試験 (TER)」³⁾、もう一つがガイドライン 431「ヒト皮膚モデル試験」である。そして、現在ガイドライン案 435「*in vitro* 膜バリア試験」⁴⁾ が検討されている。

これらはいずれも、バリデーションが実施され、Peer Review が ICCVAM でなされている試験法であり^{5, 6)}、EU の Annex V of the Dangerous Substances Directive⁷⁾ に従い定められた。

以下にこれら試験法の原理および方法の詳細について述べる。

(1) OECD ガイドライン 430「摘出皮膚電気抵抗試験 (TER)」³⁾

In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)

1) 原理 切除したラット皮膚を試験システムとして使用し、その電気抵抗を指標とする。

方法 摘出した直径20mm円盤状の皮膚(ラット、28-30日令ほど)を図4-1に示すポリテトラフルオロエチレン (PTFE) チューブの下部に表皮面を上にしてあて、ゴム製のリングではさむ。皮膚のついたPTFEチューブを硫酸マグネシウム (154mM) 溶液につけ、被験物質溶液150 μ Lを表皮面に、30°Cで24時間適用する。Wheatstone電橋装置に低電圧をかけ、100Hzにおける電気抵抗度を測定する。

さらに、電気抵抗が 5 k Ω 以下の場合には、10%スルフォローダミンB染色液にて 2 時間染色し、皮膚に吸着された色素の量を吸光度から算出する。

電気抵抗度が 5 k Ω より小さく、明らかに損傷のある場合または、損傷がなくても色素量が陽性対照物質である 10M塩酸以上の場合、腐食性と判断する。

In Vitro Skin Corrosivity Model

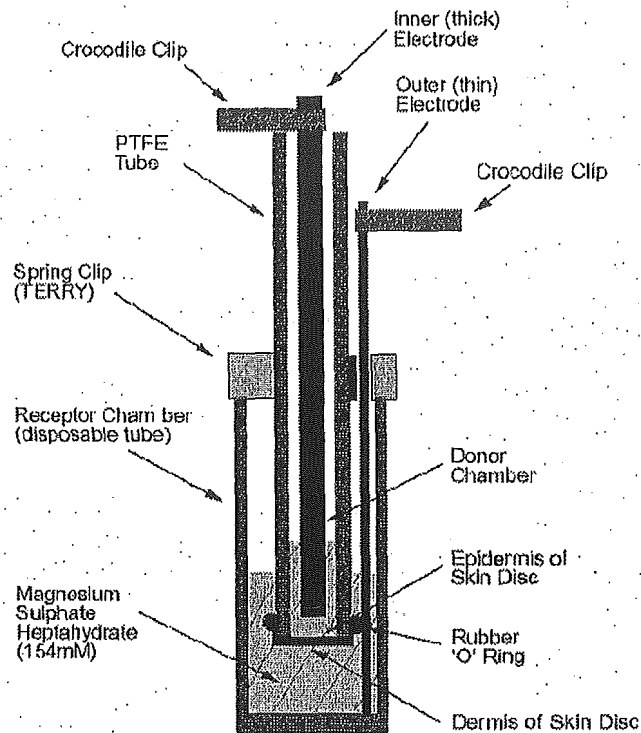


図 6-1. 摘出皮膚電気抵抗試験 (TER) 操作図 (ICCVAM⁵⁾)

(2) OECD ガイドライン 435 「in vitro 膜バリア試験」⁴⁾

In Vitro Skin Corrosion:

- 1) 原理 合成のマクロ分子生物バリアおよび Chemical Detection System (CDS) からなる。この方法の原理は、皮膚上で作用する腐食の作用機構と同様に、適用された腐食性物質により引き起こされる膜バリア障害を検出するものである。商業的には Corrositex として利用できる。
- 2) 方法 被験物質の適用により、pH インジケータの色の変化またはバリアの下のインジケータ液の特性を含む多数の変化を引き起こす。暴露時間と観察期間における変化の程度から腐食性の程度を判定するものである。

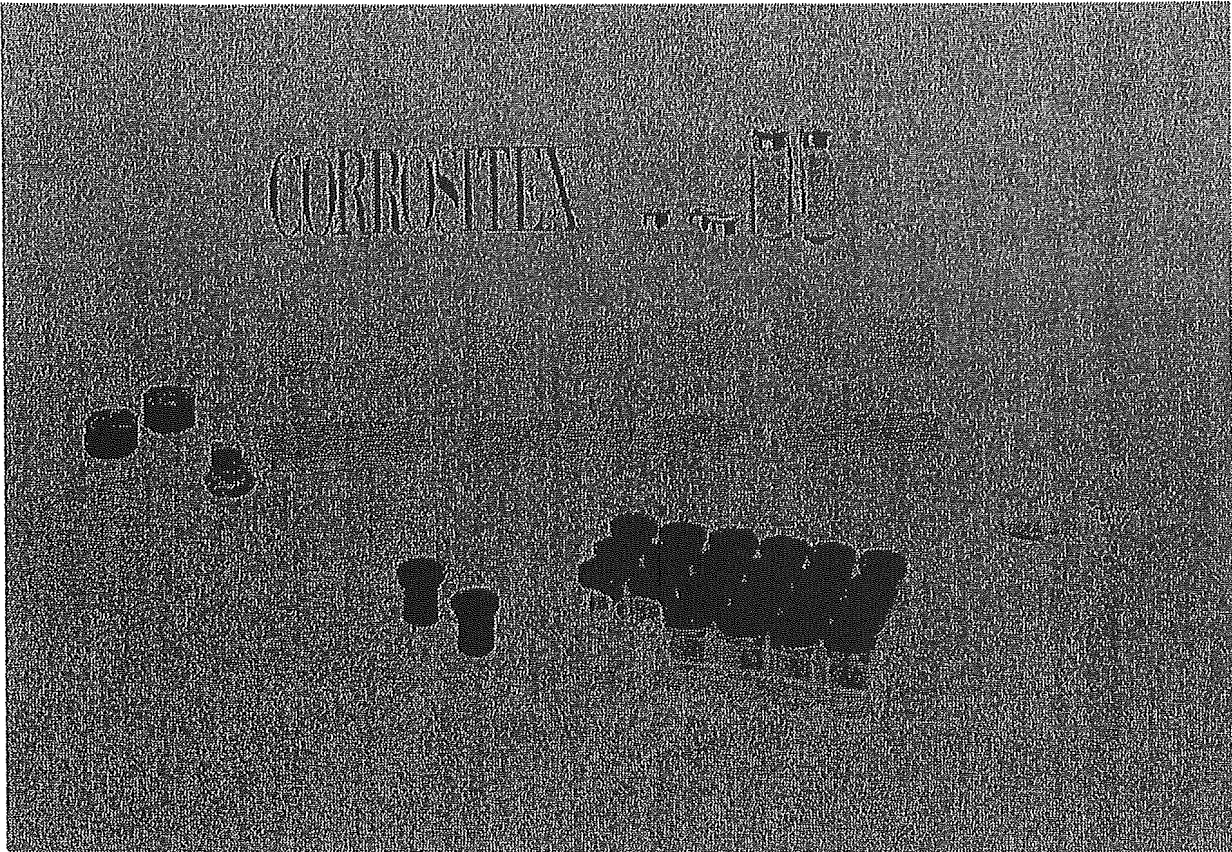


図 6-2. Corrositex™ (ICCVAM⁶⁾)

ICCVAM のまとめを表 6-1 に引用した。同じ培養皮膚でも偽陽性が多い EPISKIN™ の予測性は高くない。これは培養皮膚の性能の差というよりも、方法の違いによるものと考えられる。EpiDerm™ の方法も Pre-Validation を経て、改良された経緯があり、現方法がもっとも高い予測性を求めやすいと考える。

TER は動物の皮膚から抽出した皮膚を用いる点で完全な代替法とはいえない。また、電気伝導度を測定するため、機器が必要である。また、偽陽性率が高い。

蛋白質変性モデル (Corositex™) はもっとも簡便なキットである。ICCVAM で腐食性試験代替法として評価され、特定の目的のためには妥当な方法であると評価されている (ICCVAM 1999)。しかし、日本での販売実績が低く、Overall accuracy は今までに承認された試験法のなかではもっとも低い。

表 6-1. 他の試験法の特異性、感度、正確性の比較 (ICCVAM⁵⁾)

	Rat Skin TER	EPISKIN™	EpiDerm™ (EPI-200) (prediction model 2)	Corrositex®
Number of Chemicals	122	60	24	163
Overall Sensitivity ^b	94% (51/54)	82% (23/28)	92% (11/12)	85% (76/89)
Overall Specificity ^b	71% (48/68)	84% (27/32)	83% (10/12)	70% (52/74)
Overall Accuracy ^b	81% (99/122)	83% (50/60)	92% (22/24)	79% (128/163)
False Positive Rate	29% (20/68)	16% (5/32)	17% (2/12)	30% (22/74)
False Negative Rate	6% (3/54)	18% (5/28)	8% (1/12)	15% (13/89)
Test Chemical Inter-laboratory Coefficient of Variation	34.7 ^c	11.3 ^c	12.3 ^c	30.3 ^c
	3.8-322 ^d	3.9-148.8 ^d	0.9-51.2 ^d	7.7-252.5 ^d
	120 ^e	20 ^e	144 ^e	180 ^e

^a A chemical is first classified as positive or negative for corrosivity within each laboratory based on the majority of test results obtained (when replicate testing was conducted). Next, the chemical is classified as positive or negative for corrosivity based on the majority of test results obtained in multiple laboratories (when multiple laboratory studies were conducted). In instances where discordant results could not be resolved (i.e., there was an equal number of positive and negative calls within or across laboratories), the chemical was eliminated from inclusion in the performance calculations.

^b Sensitivity is defined as the proportion of all positive chemicals that are correctly classified as positive in a test. Specificity is defined as the proportion of all negative chemicals that are correctly classified as negative in a test. Accuracy (concordance) is defined as the proportion of correct outcomes of a method.

^c Median value

^d Range of values

^e The total number of independent values, which is calculated as the number of chemicals tested multiplied by the number of participating laboratories.

6-4) コスト、時間からの妥当性

日本で行うキットのコストを計算してみた。

EpiDerm™ の場合、1 キット(24 well)約 12 万円、1 試験で陽性、陰性対照ともに使用する場合には、8 well で約 4 万円が必要である。一方、Vitrolife-Skin の場合、1 キット(24 well)約 6 万円、1 試験で陽性、陰性対照ともに使用する場合には、8 well で約 2 万円が必要である。表に示す他のモデルと比較しても安価であり、かつキットをフルに使用すれば、よりコストダウンが計れる。時間的にも他のキットと同様、1 日で評価が可能である。

ちなみに、他の試験のまとめを表 6-2 に示したので参考にされたい。

表 6-2.試験法の比較 (ICCVAM⁵⁾)

	Rat Skin TER Assay	EPISKIN™ (prediction model B)	EpiDerm™ (EPI-200) (prediction model 2)	Corrositex®
Test Method Description	Acceptable	Acceptable	Acceptable	Acceptable
Adequacy/Completeness of Protocol	Acceptable	Acceptable	Acceptable	Acceptable
Usefulness for Assessing Corrosivity/Non-corrosivity	Acceptable (Botham et al., 1992; 1995; Fentem et al., 1998)	Acceptable (Fentem et al., 1998)	Acceptable (Liebsch et al., 2000)	Acceptable (ICCVAM, 1999)
Usefulness for Determining Packing Groups	Not Acceptable (Fentem et al., 1998)	Can group as UN packing group II/III or I (Fentem et al., 1998) ^a	Not Acceptable (Liebsch et al., 2000)	Acceptable (ICCVAM, 1999)
Repeatability and Reproducibility	Acceptable (Botham et al., 1992; 1995; Fentem et al., 1992)	Acceptable (Fentem et al., 1998)	Acceptable (Liebsch et al., 2000)	Acceptable (Fentem et al., 1998; ICCVAM, 1999)
Animal Use Refinement, Reduction, and Replacement Considerations	Refines and reduces animal use when used as a stand-alone test or in an integrated testing strategy.	Replaces animal use when used as a stand-alone test. Refines and reduces animal use when used in an integrated testing strategy.	Refines and reduces animal use when used in an integrated testing strategy.	Replaces animal use when used as a stand-alone test. Refines and reduces animal use when used in an integrated testing strategy.
Cost	~\$500-850/test	~\$450/test kit ^b	~\$200/test chemical	~\$300/test chemical
Study duration	2 work-days	1 work-day	1 work-day	≤ 4 hr/chemical

^a Since the performance of EPISKIN™ was not assessed for distinguishing between UN packing groups II and III, all R34 classifications would be conservatively classified as UN packing group II.

^b One to three chemicals may be tested per test kit; however, it is recommended by the supplier that each test chemical be assayed using 3 different skin batches/kits which equates to a total cost of ~\$430/ test chemical.

引用文献

- 1) 吉村 功ら(2005)日本動物実験代替法学会バリデーション委員会、皮膚腐食性試験バリデーション結果報告.
- 2) Liebsch, M., et al. (2000), The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin corrosivity testing, ATLA, 28, 371-401.
- 3) OECD guideline for the testing of chemicals, Draft proposal for new guideline: 430, in vitro Skin Corrosion: Transcutaneous electrical resistance test (TER).
- 4) OECD guideline for the testing of chemicals, Draft proposal for new guideline: 435, in vitro membrane barrier test method for Skin Corrosion.
- 5) ICCVAM (2002) NIH Publication No.02-4502 ICCVAM Evaluation of EPISKIN™, EPIDERM™(EPI-200) and Rat skin transcutaneous Electrical resistance (TER) assay.
- 6) ICCVAM (1999) NIH Publication No. 99-4495 Corrositex: An In vitro test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals.
- 7) EU, Annex V of the Dangerous Substances Directive

第7章 まとめ

主に第5章にまとめたが、陽性対象物質、皮膚腐食性物質6品目、非腐食性物質6品目（その内劇物3、非劇物9）を用い、6施設によって EpiDerm™ と Vitrolife-Skin™ との比較バリデーションを行った¹⁾。

その結果、EpiDerm™ で腐食性物質を正しく腐食性と判定する感度(sensitivity)は96.7%、非腐食性物質を正しく非腐食性と判定する特異性(specificity)は66.7%であった。なお、偽陽性と判定したのは、5% Potassium hydroxide と Lactic acid であり、いずれの施設でも腐食性物質と判定した。腐食性との結果が得られたもののうち、真に腐食性である割合、即ち陽性予知能力(positive predictivity)は74.4%であった。非腐食性との結果が得られたもののうち、真に非腐食性である割合、即ち陰性予知能力(negative predictivity)は95.2%であった。正しい判定結果が得られた割合、即ち一致率は81.7%であった。即ち、ECVAM や ICCVAM, OECD で腐食性試験代替法として承認された EpiDerm™ は若干偽陽性があるが、腐食性物質を腐食性物質と判定する十分な能力を有することが確認された。

一方、Vitrolife-Skin™ では感度は100%、特異性は66.7%、陽性予知能力は75%、陰性予知能力は100%、一致率は83.3%であった。EpiDerm™ の場合と同様に、非腐食性物質を誤って腐食性物質と判定したのは、5% Potassium hydroxide と Lactic acid であり、いずれの施設でも腐食性物質と判定した。即ち、EpiDerm™ と Vitrolife-Skin™ いずれにおいてもほとんど同じ成績が得られた。判断を誤る物質も同じであった。これらの結果から腐食性試験代替法として国際的に承認されている EpiDerm™ と同等の識別能力を有するものと考えられた。また、EpiDerm™ のような表皮モデルと Vitrolife-Skin™ のような皮膚モデルの結果にはほとんど差がないことが明らかになった。

今回のバリデーションでは Vitrolife-Skin™ で、プロトコルの改善が必要という解決すべき問題点も残されているが、技術的な問題点も明確になった。また、使用した被験物質が少なかったが、偽陰性率が低く、有望な試験法であると考察できる。一方、ICCVAM ではヒト皮膚モデルを用いる皮膚腐食性試験代替法について、偽陰性物質の再評価が今後予定されており、今回日本で行ったバリデーションにおける偽陰性物質なしという結果が注目されている。この検討には日本からも今回のキャッチアップバリデーションデータ（早期論文は必要である）や Morikawa らの論文（2005）²⁾ を提供して、追加試験の必要性なども考慮の上、国際的な意見交換を進めていきたいと考えている。

なお、in vitro 皮膚腐食性試験結果を毒劇物の評価に用いることが、厚生労働省の毒劇物部会で承認された。EpiDerm™ は ICCVAM で評価されているが、まだ評価されていない Vitrolife-Skin™ については、評価会議における評価を早急に行う必要がある。

引用文献

- 1) 吉村 功ら(2005)日本動物実験代替法学会バリデーション委員会、皮膚腐食性試験バリデーション結果報告.
- 2) Morikawa, N., et al. (2005) Experimental study on a novel chemical application procedure for in vitro skin corrosivity testing using the Vitrolife-Skin™ human skin model, AATEX, 11, 1, 68-78. s

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学、教授）

研究要旨

光毒性のみならず光アレルギー性も評価できうる *in vitro* 代替法として、被験物質の表皮角化細胞（ケラチノサイト）に対するアポトーシス誘導能を検討した。まず、UVB 誘導性ヒトケラチノサイト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 3, 3', 4' 5-tetrachlorosalicylanilide (TCSA) 溶液にケラチノサイトを浮遊し UVB を照射し、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た。10⁻⁵ M の濃度で作製した TCSA 光修飾表皮細胞に UVA 4 J/cm² 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した。そこで bithionol、6-methylcoumarin、diphenhydramine、chlorpromazine、sparfloxacin (SPFX)、enoxacin (ENX) について UVA 照射によるアポトーシス、ネクローシスを検討したところ、TCSA、bithionol、chlorpromazine sparfloxacin、enoxacin がアポトーシスを誘導した。これらの物質の光アレルギー性を考慮するとアポトーシス誘導能は光アレルギー性をも反映していると考えられた。

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が関わり、その連鎖の結果として起こる。ほとんどの光アレルギー性物質は、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る。光抗原はさらに抗原提示樹状細胞であるランゲルハンス細胞により提示され、リンパ節に遊走したのちに T 細胞を感作する。

近年 cross priming あるいは cross presentation という現象が主に、腫瘍免疫の分野で言われている。これは抗原を担った

細胞が近傍の樹状細胞によって再提示されて T 細胞を感作する現象である。すなわち抗原を最初に担った細胞以外の細胞が抗原提示を行うという概念である。この際、最初に抗原処理される細胞がアポトーシスに陥っていると、より cross priming が起こりやすいと報告されており、ひいてはアポトーシス誘導能がアレルギー反応をおこしやすいか占う一つの指標となる訳である。本研究は、アポトーシスをヒト表皮角化細胞（ケラチノサイト）を用いて *in vitro* の反応で検出することを目的とする。

B. 研究方法

B-1) ヒトケラチノサイトにおけるアポトーシス、ネクローシス解析法の確立

我々はすでにUVBを照射することによって誘導される角化細胞のアポトーシスの実験系を確立し、UVBが容量、時間依存的にアポトーシスを誘導することを確認した。ここではヒト表皮角化細胞はcell lineである HaCaT 細胞を用いて、紫外線照射装置を、Broadband-UVB 照射装置と Narrowband-UVB 照射装置の 2 種類を使用することで確認実験の幅を拡げた。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 に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 % semiconfluent 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。

B-4) bithionol、6-methylcoumarin、diphenhydramine、chlorpromazine、spafloxacin (SPFX)、enoxacin (ENX) によるアポトーシス、ネクローシス解析

上記物質の溶液に HaCaT 細胞をインキュベーションし UVA を照射し、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) ヒト表皮角化細胞における Broadband-UVB、Narrowband-UVB によるアポトーシス、ネクローシスの誘導

Broadband-UVB 0, 30, 60, 100 mJ/cm² 照射範囲内、および Narrowband-UVB 0, 300, 600, 1000 mJ/cm² 照射範囲内において、紫外線照射量、時間依存性にアポトーシス細胞、ネクローシス細胞が増加した。鋭敏に確実に両UVB波長域でアポトーシス、ネクローシスが誘導可能であった。

C-2) 代表的な光感作物質 TCSA と表皮角化細胞との光結合

HaCaT角化細胞をTCSA溶液に浸し、インキ

ュベーションした後、UVA 4 J/cm² 照射した。この細胞を洗浄した後に、TCSAの光産物の有無を蛍光顕微鏡下に確認した。HaCaT 細胞の細胞表面、細胞質内に蛍光物質すなわちTCSAの光産物が存在することが確認された (Fig. 1)。

C-3) TCSA と UVA によるアポトーシス、ネクローシスの誘導

HaCaT細胞をTCSAとインキュベーションの後にUVAを照射し、フローサイトメトリによりアポトーシスとネクローシスを解析した (Fig. 2)。TCSAの濃度とUVA照射の有無に応じてアポトーシスとネクローシス細胞が生成されることが明らかとなり、これにより他の光感作物質のアポトーシスとネクローシス能も占うことができるのか検討した。

B-4) bithionol、6-methylcoumarin、diphenhydramine、chlorpromazine、spafloxacin (SPFX)、enoxacin (ENX) によるアポトーシス、ネクローシス解析
上記物質の溶液に HaCaT 細胞をインキュベーションし UVA を照射し、アポトーシス、ネクローシスの割合を解析した。アポトーシスは TCSA も含めて、bithionol、chlorpromazine、spafloxacin、enoxacin において 10⁻⁴ または 10⁻⁵ M の濃度で観察された (Fig. 3)。ネクローシスはこれらの化学物質で 10⁻⁴ の濃度で認められた。diphenhydramine or 6-

methylcoumarin はアポトーシスもネクローシスも示さなかった。TCSA と chlorpromazine はカスパーゼ-3 と PARP の活性化を示し、アポトーシス誘導性であることが確認された (図3)。

D. 考察

接触光過敏症のメカニズムは、外因性物質に対する抗原特異的なT細胞を生み出す相(感作相)と、再び侵入した当該外因性物質にT細胞が反応し皮膚炎を形成する相(惹起相)とに分かれる。感作相は、1) 樹状細胞(表皮ランゲルハンス細胞または真皮樹状細胞)による抗原提示と成熟化(活性化)、2) 樹状細胞の所属リンパ節への遊走とリンパ節内のT細胞の感作、という連続する各ステップに分かれる。このうち1)のステップは外因性物質が過敏症を起こしうるかを決定する最も重要な段階であり、①化学物質の抗原提示細胞表面蛋白質への共有結合(光ハプテン能)、②化学物質の抗原提示細胞に対する成熟化誘導、が要件となる。またランゲルハンス細胞は表皮角化細胞によって囲まれて存在し、その角化細胞が外因性化学物質に反応して IL-1 α , TNF α , GM-CSF といったサイトカインを産生し、これらサイトカインがランゲルハンスの成熟をさらに促す。したがって、③化学物質のKCIに対するサイトカイン産生誘導も要件の一つである。抗原を担った細胞が

それ自体T細胞の感作を誘導するのではなく、一旦他の抗原提示細胞に取り込まれて、その細胞が抗原を提示することを cross priming という。この際、元の抗原を担った細胞(角化細胞が主)がアポトーシスを起こしていると、近傍の樹状細胞は成熟しやすく抗原提示能が増強する。すなわち、ある化学物質+UVA が細胞のアポトーシスを引き起こし易いかどうかは、その物質が抗原として提示されやすいか、ひいては光アレルギー物質であるかを、占うひとつの目安になる。そこで、④化学物質の角化細胞に対するアポトーシス誘導を検討した。

今回の研究において、フローサイトメトリーを用いたアポトーシス、ネクローシスの解析は、光感作物質+UVAで処理した細胞でも非常に簡便でかつ鋭敏に測定することができた。TCSA, bithionol, chlorpromazine, sparfloxacin, enoxacin において 10^{-4} または 10^{-5} Mの濃度でアポトーシスを誘導し、ネクローシスはこれらの化学物質で 10^{-4} の濃度で認められた。diphenhydramine or 6-methylcoumarin はアポトーシスもネクローシスも示さなかった

本研究によって、少なくとも4種類の被験物質 10^{-4} Mの濃度とUVA 4 J/cm² 照射することで、アポトーシスを多くの光感作性物質で誘導できることが明らかとなった。こうした物質は光毒性物質であるばかりでなく、光アレルギー性物質であることも臨床的に知られ

ている。アポトーシスに陥った光抗原を担うケラチノサイトがcross primingによって、近傍の樹状細胞によって抗原提示されるのであれば、アポトーシス誘導能と光アレルギー性の間に関連が生まれる。今回の結果はこうしたことを裏付けている。また本検査は光毒性と光アレルギーの両者に対する代替法の一つになりうると考えられた。

E. 結論

光アレルギーを生じる光感作性物質で代表的なTCGA、bithionol、chlorpromazine、sparfloxacin、enoxacin において、アポトーシス誘導能があることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表

- 1) 栗田晶子他：光感作物質とUVA照射処理による表皮角化細胞へのアポトーシス誘導能の評価. 日本光医学・光生物学会。2005. 8. 6.
- 2) 栗田晶子他：光感作物質とUVA照射処理による表皮角化細胞へのアポトーシス誘導能の評価. 第 35 回 UV-ABCclub, 幕張プリンスホテル, 千葉, 2006. 3. 4.

論文発表

- 1) Tokura Y: Photocontact dermatitis:

from basic photobiology to clinical relevance. J Environ Dermatol 12: 71-77, 2005.

- 2) Misawa J, Moriwaki SI, Kohno E, Hirano T, Tokura Y, Takigawa M: The role of low-density lipoprotein receptors in sensitivity to killing by Photofrin-mediated photodynamic therapy in cultured human tumor cell lines.

J Dermatol Sci 2005

- 3) Sayama K, Kobayashi Y, Fujita H, Ito A, Tokura Y, Sasaki M. Determination of action spectrum for sparfloxacin-photosensitized single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA.

Photodermatol Photoimmunol Photomed 21:287-292, 2005.

- 4) Imai S, Atarashi K, Ikesue K, Akiyama K, Tokura Y. Establishment of murine model of allergic photocontact dermatitis to ketoprofen and characterization of pathogenic T cells. J Dermatol Sci 41:127-36. 2006

- 5) Orimo H, Tokura Y, Hino R, Kasai H. Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the DNA of cultured human keratinocytes by clinically used doses of

photosensitizing chemicals plus UVA.

(投稿中)

H. 知的財産権の出願, 登録状況

無い。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
戸倉新樹	光科学療法	「光科学研究の最前線」編集委員会編	光科学研究の最前線	強光子場科学研究懇談会出版	東京	2005	366-367
戸倉新樹	後天性光線過敏症の病態	斎田俊明, 飯塚一編	皮膚疾患の最新医療	先端医療技術研究所	東京	2006	221-224
戸倉新樹	新・皮膚悪性リンパ腫アトラス	瀧川雅浩他編.	光化学療法	文光堂	東京	2006	185-187
戸倉新樹	内服テストと内服照射テスト・皮膚科診療プラクティス. 19.		薬疹を極める	文光堂	東京	2006	125-127

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tokura Y	Photocontact dermatitis: from basic photobiology to clinical relevance	J Environ Dermatol	12	71-77	2005
Misawa J, Moriwa ki SI, Kohno E, Hirano T, Tokura Y, Takigawa M	The role of low-density lipoprotein receptors in sensitivity to killing by Photofrin-mediated photodynamic therapy in cultured human tumor cell lines.	J Dermatol Sci	40	59-61	2005
Sayama K, Kobayashi Y, Fujita H, Ito A, Tokura Y, Sasaki M	Determination of action spectrum for sparfloxacin-photosensitized single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA.	Photodermatol Photoimmunol Photomed	21	287-292	2005
Imai S, Atarashi K, Ikesue K, Akiyama K, Tokura Y	Establishment of murine model of allergic photocontact dermatitis to ketoprofen and characterization of pathogenic T cells.	J Dermatol Sci	41	127-36	2006

Orimo H, Tokura Y, Hino R, Kasai H.	Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the DNA of cultured human keratinocytes by clinically used doses of narrowband and broadband ultraviolet B and psoralen plus ultraviolet A.	Cancer Sci	97	99-105	2006
戸倉新樹	光線過敏症における光アレルギーの位置	皮膚アレルギーフロンティア	3	7-10	2005
戸倉新樹	光アレルギーの臨床をどうするか	皮膚アレルギーフロンティア	3	32-40	2005
戸倉新樹	薬剤性光線過敏症	MB Derma	96	13-19	2005
戸倉新樹	後天性の光線過敏症はなぜ起こる？	マルホ皮膚科セミナー	174	28-32	2005
戸倉新樹	内服薬で起きる皮膚炎：薬剤性光線過敏症	毎日ライフ	6	52-55	2005
西尾大介, 戸倉新樹	薬剤性光線過敏症	アレルギーの臨床	25	774-778	2005
杉田和成, 戸倉新樹	慢性光線性皮膚炎と免疫抑制状態	アレルギーの臨床	25	784-788	2005
戸倉新樹	抗生剤・抗菌薬による光線過敏症	Topics in Atopy	4	44	2005
Kurita M, Shimachi T, Kobayashi M, Kabashima K, Tokura Y	Induction of keratinocyte apoptosis by photosensitizing chemicals plus UVA.				投稿中

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総合研究事業

分担研究報告書

細胞毒性による *in vivo* 全身毒性の予測について
-代謝活性化とタンパク結合-

分担研究者： 田中 憲徳 (財) 食品薬品安全センター秦野研究所 遺伝毒性部長

研究要旨

細胞毒性の発現に関わる要因として、生体内での薬物代謝による要因以外に、化学物質とタンパクとの結合による毒性変化が考えられる。そこで本研究では、19種の化学物質を用い、血清タンパクであるアルブミンとの結合で、どの程度毒性に変化がみられるかを調べた。その結果、lauryl sulfate sodium salt においてはアルブミン添加においても S9 添加系と同じように毒性の軽減が認められた。試験に用いた化学物質のうち 6-*tert*-butyl-*m*-cresol では S9 非添加系、アルブミン添加系、および S9 添加系で IC50 値がそれぞれ 0.036 mg/mL、0.053 mg/mL、0.068 mg/mL、また *N*-phenylmaleimide では IC50 値がそれぞれ 0.0048 mg/mL、0.0091 mg/mL、0.035 mg/mL となり、どちらの化学物質においても S9-と比較して 2 倍程度の IC50 値を示し、アルブミン添加による効果が認められ、化学物質とタンパクの作用による毒性の軽減が観察された。以上のように、S9 による代謝活性化試験での結果には、単に代謝能による毒性変化だけでなく、タンパクの作用による変化も関与している事が示唆された。

A. 研究目的

動物を用いる急性毒性試験の代替試験法として細胞毒性試験を適用する際の大きな問題点は、*in vitro* の系で生体内と同様な薬物代謝系を再現できるようにすることである。細胞毒性試験において代謝系を導入することにより、*in vivo* 毒性の予測率がよくなることが推測されることから、昨年度は、既存化学物質 21 物質を用いて、S9 mix の存在下及び非存在下で細胞毒性値：IC50 値を求め、*in vivo* 急性毒性の LD50 値および反復経口毒性の無影響量の値との相関を調べた。

しかしながら、S9 添加 (S9+) / 非添加 (S9-) の 6 時間処理では代謝活性化の有無にかかわらず、細胞毒性値と *in vivo* 毒性の間に良い相関は得られなかった。その理由として、lauryl sulfate sodium salt (SDS) のような界面活性剤では、その毒性が代謝活性化によらないにもかかわらず S9 添加により毒性の軽減が認められたことから、薬物代謝による毒性の変化以外に、S9 を添加することによる薬物とタンパク結合に

毒性の変化の問題が加わっている事が示唆された。そこで本研究では、これまで実施した既存化学物質の中より代謝がらみで毒性に変化がみられる化学物質を用いて、タンパク結合による毒性の軽減を調べた。

B. 研究方法

I. B. 研究方法

細胞毒性試験として、BALB/3T3 clone A31 細胞を用いた 96 ウェルプレートによるニュートラルレッド法により、下記の試験を行った。

1. 界面活性剤である SDS とシクロフォスファミド(CP)を用い S9 の有無および加熱した S9 による毒性の変化
2. SDS を用いウシ血清アルブミンの濃度の違いによる毒性の変化
3. S9 存在下で毒性が発現する物質の、アルブミンの有無による毒性発現
4. 被験物質のアルブミン添加による毒性発現の変化

化学物質は、Table 1 に示す 16 種の化学物質を用いた。細胞播種 1 日後に化学物質で 6 時間処理し、その後新鮮な培地に交換して 18 時間培養した。培地中の S9 の濃度は 5% で試験を行った。

(倫理面への配慮)

本実験では動物を用いないこと、また倫理面で配慮が必要なヒト材料を用いる事は無かったことから、動物倫理およびヒト材料を用いる場合の安全性、ならびに倫理基準に該当する要件はないと判断した。

C. 結果と考察

1. 界面活性剤である SDS と CP を用いて S9 の有無および加熱した S9 による毒性の変化

S9 を 56°C で加熱 (5 分、15 分、30 分) すると、5 分以上の加熱で S9 は粘性が高くなり変成していた。CP (Fig 1) では変成したタンパクが細胞の上に張り付いた形となり、細胞の生存が確認できず、また、変成したタンパクに吸着し

た NR が完全に洗浄できなかったことから、NR による生存率測定は真の生存率を反映していないことが考えられた。SDS (Fig 2) においては、15 分間処理した S9 を用いたが、加熱した S9 は CP 処理の時と同様に粘性が高く洗浄後も細胞にくっついている形となったが、毒性としては S9-とほぼ同じ細胞毒性を示し、S9+で認められた効果が消失した。そこで、S9 変成による試験条件を取りやめ、ウシ血清アルブミンを用いてタンパクの作用を検討した。

2. SDS を用いてウシ血清アルブミンの濃度の違いによる毒性変化 (Fig 3)

我々が実験で使用した S9 は 10 ロットの平均で S9 中の総タンパク量が 26 mg/mL であり、培地中の S9 濃度は 5% であることから、培地中の S9 由来のタンパク量は 1.3 mg/mL 程度であった。そこで、牛血清アルブミンを培地 (CS 10%) に 0.01、0.1、1.0、2.0、5.0 mg/mL 添加した場合の SDS の細胞毒性について検討した。その結果、0.01~1.0 mg/mL では SDS のみを処理したときとほぼ同じ細胞毒性 (IC50 値: 0.094~0.097 mg/mL) を示したが、2.0 mg/mL および 5.0 mg/mL においては毒性の軽減が認められた (IC50 値: 0.19~0.20 mg/mL)。この細胞毒性は S9+処理の時の IC50 値とほぼ同じ値で、SDS の S9+による毒性の軽減は代謝活性化によるものではなく、タンパク質との相互作用によるものであると考えられる。SDS においては、タンパク量は 2.0 mg/mL 以上になっても毒性の軽減作用の増強はそれ以上認められなかった。

3. 代謝活性化により毒性を発現する物質のアルブミンの有無による毒性発現

SDS においてはタンパクの存在によりその毒性が軽減したが、一般的に代謝活性化により毒性の増強が認められている物質について、アルブミンの存在によって毒性が変化するかを調べた。代謝活性化により毒性の増強が知られている CP とベンゾ[a]ピレン (BaP)、および対照として SDS を用いてアルブミン非含有培地と培地にアルブミンを 2.0 mg/mL になるように加えたものに S9 mix を添加、または非添加

した系で実験を行った。

SDS (Fig 4) ではアルブミン非添加の S9-系で IC50 値は 0.96 mg/mL であり、アルブミン添加の S9-、アルブミン添加および非添加の S9+系の 3 系すべてで IC50 値が 0.19 mg/mL となった。アルブミン添加系は S9+と同じ細胞毒性を示したが、S9+とアルブミンによる相乗効果は認められなかった。これはアルブミン量が増えても細胞毒性に変化が認められなかったのと同様の結果と考えられる。また、SDS を用い、アルブミンの添加および非添加の S9-系とアルブミン非添加の S9+系の 3 系列で独立した 5 回の実験を行った結果、5 回のすべてで同じ結果が得られたことから、再現性のある安定した結果であると考えられた (Fig 5)。

CP (Fig 6) では、アルブミンの添加非添加に関わらず、S9 の有無によって毒性が決定した (アルブミン添加および非添加の S9-系: 最高濃度 0.4 mg/mL まで細胞毒性は認められない、アルブミン添加および非添加の S9+系: IC50 値 0.057 mg/mL)。一方 BaP (Fig 7) では、アルブミン添加および非添加の S9-系においてはどちらも 0.05 mg/mL まで細胞毒性は認められなかった。S9+系ではアルブミン添加により若干の毒性軽減が認められた (IC50 値添加系: 0.0033 mg/mL、非添加系: 0.0023 mg/mL) が、S9-系と比較すると強い細胞毒性がみられた。

4. 被験物質のアルブミン添加による毒性発現の変化

すでに NR 法で代謝活性化による反応性のわかっている化学物質 12 物質 (S9+と S9-で毒性の変わらないもの 2 物質、S9+で毒性の強いもの 5 物質、S9-で毒性の強いもの 5 物質) と CHL 細胞で S9-で S9+よりも毒性が強かった 4 物質の合計 16 物質について、アルブミンの添加および非添加の S9-系とアルブミン非添加の S9+系の 3 系列で実験を行った。

IC50 値と生存曲線から

既に NR 法での細胞毒性結果の出ている 12 物質については S9+および S9-における細胞毒性結果は以前の NR 法での毒性傾向とほぼ同じであったことから、NR 法自体が安定した

試験法であることが確認された。

S9+と S9-で毒性の変わらないもの 2 物質 (Fig 8): 2-Ethylanthraquinone, thiourea dioxide

2-Ethylanthraquinone は IC50 値で比較すると、S9+、S9-およびアルブミン添加系がそれぞれほぼ 1/2 ずつの値 (S9+: 0.20 mg/mL, S9-: 0.13 mg/mL, アルブミン: 0.061 mg/mL) となっているが、生存曲線からは S9-とアルブミン添加系ではほぼ同じ曲線を示していることからアルブミンによる効果はないものと考えられる。Thiourea dioxide は S9-と S9+では S9+でやや低めの濃度から毒性兆候が認められるもののほぼ同程度の毒性を示すと考えられる。アルブミン添加系については S9-で生存率が 10% 程度の濃度において約 50% の生存が認められることから、やや効果が認められたと考えられる。

S9+で毒性の強いもの 5 物質 (Fig 9):

3-Aminophenol, 2,4-di-tert-butylphenol, 3-ethylphenol, 3-methylphenol, N-ethylaniline

3-Aminophenol でややばらつきが認められるものの、2,4-di-tert-butylphenol、3-ethylphenol、3-methylphenol、N-ethylaniline では、S9-とアルブミン添加系がほぼ同一の生存曲線および IC50 値を示したことから、これらの 5 物質においてはアルブミンの効果は認められないと考えられた。

S9-で毒性の強いもの 5 物質 (Fig 10):

4-Aminophenol, 6-tert-butyl-m-cresol, di-n-butyl adipate, 2-ethylhexyl methacrylate, N-phenylmaleimide

4-Aminophenol、di-n-butyl adipate、および 2-ethylhexyl methacrylate では S9-とアルブミン添加系がほぼ同一の生存曲線および IC50 値を示したことからこれらの 3 物質においてはアルブミンの効果は認められないと考えられた。6-tert-butyl-m-cresol では S9-、アルブミン添加系、および S9+で IC50 値がそれぞれ 0.036 mg/mL、0.053 mg/mL、0.068 mg/mL、また N-phenylmaleimide では IC50 値がそれぞれ 0.0048 mg/mL、0.0091 mg/mL、0.035 mg/mL となり、どちらの化学物質においても S9-と比較して 2 倍程度の IC50 値となり、アルブミンによる効果が認められた。

NR法では未確認だが、CHL細胞でS9-でS9+よりも毒性が強かった4物質：2,2'-Methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol)、4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)、triisobutylene、2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate

2,2'-Methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol)はS9-とアルブミン添加系がほぼ同じ生育曲線およびIC50値を示したことからアルブミンによる効果は認められなかった。4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)では、S9-およびアルブミン添加系で最低濃度においても細胞が死滅していたため、はっきりとした結果は出なかった。Triisobutyleneは高濃度域において物質が油滴状となって処理培地に浮いたことから、細胞への作用が弱まり濃度が高くなるに連れて生存率の上昇が認められたものと思われるが、S9-とアルブミン添加系で低濃度においてほぼ同じ毒性兆候を見せたことからアルブミンによる効果は認められないと考えられた。2,2,4-T rimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrateではIC50値がS9-では0.78 mg/mL、アルブミン添加系では1.21 mg/mL、S9+では1.65 mg/mLであり、S9-で生存率が50%以下であった濃度においてアルブミン添加系では80%近くの生存率を示したが、生存曲線はS9-と近いものであったことからはっきりとした効果は確認できなかった。

以上の結果より、アルブミンの毒性に及ぼす効果はSDSや6-tert-butyl-m-cresol、N-phenylmaleimideの結果から、S9-の場合の毒性と比較してIC50値の2倍程度の軽減作用になると考えられた。またこれらの毒性発現は、タンパク質の大きさや濃度によって、また化学物質により反応性が違う可能性が示唆された。このように、S9による代謝活性化試験での結果には、単に代謝能による毒性変化だけでなく、タンパク結合による変化も関与している事が示唆された。

D. 研究発表

1. 論文発表

Ryo Kurihara, Fujio Shiraiishi, Noriho Tanaka, Shinya Hashimoto, Presence and estrogenicity of anthracene derivatives in coastals Japanese waters, Environmental Toxicology and Chemistry, 24, 1984-1993 (2005)

Agneta Rosengre, Linda Faxius, Noriho Tanaka, Mika Watanabe, Lars Magnus Bjursten, Comparison of implantation and cytotoxicity testing for initial toxic biomaterials, Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 75A Issue 1, 115-122 (2005)

Shin Asada, Kiyoshi Sasaki, Noriho Tanaka, Ken Takeda, Makoto Hayashi and Makoto Umeda, Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 Cells (Bhas 42 Cells), Mutation Res., 588:7-21 (2005)

Kiyomi Ohmori, Makoto Umeda, Noriho Tanaka, Hiroki Takagi, Isao Yoshimura, Kiyoshi Sasaki, Shin Asada, Ayako Sakai, Harumi Araki, Masumi Asakura, Hiroshi Baba, Youichi Fushiwaki, Shuichi Hamada, Nobuyui Kitou, Tetsuo Nakamura, Yoshiyuki Nakamura, Hidetoshi Oishi, Satoshi Sasaki, Sawako Ahimada, Toshiyuki Tsuchiya, Yoshifumi Uno, Masataka Washizuka, Satoshi Yajima, Yasuhito Yamamoto, Eiji Yamaura and Tomoko Yatsushiro: An inter-laboratory collaborative study by the Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in Japan, on a cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells, ATLA 33, 619-639 (2005)

2. 学会発表

田中憲穂、板垣宏、若栗忍、北垣雅人、中川ゆづき：単回投与毒性試験代替法の開発研究および皮膚モデルを用いる遺伝毒性試験法の開発研究、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原

浅田晋、佐々木澄志、田中憲穂、梅田誠：Bhas 42細胞を用いるイニシエーター/プ