

米国官庁間代替法バリデーション委員会 (ICCVAM) の the Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods (SACATM) は2003年8月にICCVAMに眼刺激性物質の同定ができる *in vitro* 試験法のバリデーション状況を評価することを推薦した。

米国環境保護局 (EPA) は2003年10月に4種類 Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test (ウシ摘出角膜の混濁及び透過性試験)、The Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) (受精鶏卵の漿尿膜試験)、The Isolated Chicken Eye (ICE) test (鶏の摘出眼球試験)、The Isolated Rabbit Eye (IRE) test (ウサギの摘出眼球試験) を眼刺激性又は腐食性をスクリーニングできる *in vitro* 試験法でICCVAMによって評価される方法として推薦している。

ICCVAM、国立環境衛生科学研究所 (NIEHS)、NTP 代替試験法省庁間センター (NICEATM) は2005年に *in vitro* 眼刺激性試験法バリデーション評価のための専門家委員会を開催し、*in vitro* 試験法として、上記4種類の試験法を提案し、それらの眼刺激性試験代替法の評価 (peer review) を実施している。ICCVAM は2006年3月に最終バックグラウンドレビュー文書 (BRDs) を公表した。これらの方法については、以下のように見解がまとめられる。

(1) 4法はいずれも *in vivo* 試験法を代替する方法とはならないこと、(2) ICCVAM が推奨する限定的に使用でき、眼腐食性など強い眼刺激性物質のスクリーニングに使用できる方法としてBCOP試験及びICE試験、(3) 現時点では推奨できず、眼腐食性や強い眼刺激性物質を同定するためにはプロトコールや判断基準の最適化、追加バリデーションが必要である方法としてHET-CAM試験及びIRE試験を報告している。

また、2006年11月にはNICEATMとICCVAMが代替法5ヵ年計画に関するパブリックコメントを要求し、その中で試験開発の優先分野として、急性眼刺激性・腐食性を挙げている。欧州においては、消費者向けの化粧品および非食品に関する科学委員会 (SCCNFP) は化粧品成分の安全性を確認するために実施される毒性試験について、ガイドラインを策定しており、その第5版が第25回総会 (2003年10月20日) で採択されている。その中で、眼刺激性試験は、今のところ、従来のDraize *in vivo* 眼刺激試験<sup>85)</sup>の代わりになるようなバリデー

ションが完了した代替法は存在しないが、BCOP試験 (ウシ角膜混濁および透過性試験) が中性の有機化学物質に関して適当とされている<sup>86)</sup>。RBC (赤血球) 試験およびNRU (中性赤摂取) 試験は界面活性剤の評価に有用であるとしている。また、HET-CAM試験 (受精鶏卵の漿尿膜試験)<sup>87)</sup>は、化粧品最終製品のスクリーニング試験にしばしば使用される有効な代替法であり、正式なバリデーションは行われていないが、フランスなどでは法律でも取り上げられている。

REACH (Registration Evaluation and Authorization of Chemicals) における代替法の検討としては、Replacement (置換) については、開発中の試験法として、眼刺激性、急性眼刺激/腐食 (OECD TG405, ECVAM/ICCVAM 共同プロジェクト)。また、*in silico* 法について、限定的な方法に眼刺激性が挙げられている。SCAAT (The COLIPA Steering Committee on Alternatives to Animal testing) では、現在、4つのTask Forceがあり、Eye Irritation Task Forceも含まれている。その分科会では、1) 生理的な機能と *in vitro* 試験での角膜から遊離される損傷のシグナルにおける変化のキネティクスが、回復性も含めた眼刺激を予測できるか、2) ヒトの不死化細胞や3次元ヒト角膜・結膜を用いた場合の損傷の度合と回復性に関する指標の同定、及び、3) ゲノミクスプロジェクトの眼刺激性における検討を実施している。わが国における代替法のバリデーションについては、1990年、厚生省 (当時) が新規原料配合化粧品の安全性評価のための研究を発足、その後、産学官が参加して眼刺激性試験の *in vitro* 試験に関する評価が行われた<sup>88)</sup>。前述した、米国、欧州などの状況も踏まえ、現在、化粧品工業連合会では受精鶏卵を用いた方法<sup>89)</sup>、培養細胞を用いた方法<sup>90)-93)</sup>、赤血球を用いた方法<sup>94)</sup>、三次元モデルを用いた方法<sup>95)</sup>、無生物を用いた方法<sup>96), 97)</sup>、the Isolated Rabbit Eye (IRE) Test Method<sup>98), 99)</sup>、the Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method<sup>98), 100)</sup>、the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method<sup>98), 101)</sup>、the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method<sup>98), 102)</sup>を紹介する「化粧品の安全性評価に関する指針」の改訂作業を進めている。

C-5-4 皮膚アレルギー性

### ①概要

2006年度に、複数の施設によるバリデーション、ならびに共同研究の成果が報告された感作性試験の代替試験法としては、①非放射性 LLNA (Non-Radioactive Endpoint Local Lymph Node Assay)<sup>103)-106)</sup>、②THP-1 細胞を用いた皮膚感作性試験代替法 (human Cell Line Activation Test; h-CLAT)<sup>107)-113)</sup>、ならびに③U937 細胞を用いた皮膚感作性試験代替法<sup>12)</sup>が挙げられる。

### ②各試験法の状況

放射性 LLNA は、マウス *in vivo* 試験であり、いわゆる Reduction および Refinement を意図した代替法と位置づけられる。しかし、従来の LLNA は、ラジオアイソトープの施設を必要とする試験法であることから、より簡便な非放射性 LLNA の開発が進められている。そのひとつの方法である LLNA-DA 法は、2006 年より本格的な多施設バリデーション研究が開始され、本年度の日本動物実験代替法学会にて途中結果が報告されている<sup>103)</sup>。また、それに関連した内容で、本バリデーション研究の精度の向上、結果の再現性を正しく評価するため、データの数学的な処理方法に関しても同学会にて報告された<sup>104)-106)</sup>。

THP-1 細胞を用いた皮膚感作性試験代替法 (h-CLAT)、および③U937 細胞を用いた試験法は、ヒト単球由来細胞株を用いる *in vitro* 試験で、化学物質曝露時の細胞表面の CD86 や CD54 の発現量変化をフローサイトメトリーで評価する試験法である。②h-CLAT は、日本企業である株式会社資生堂と花王株式会社の共同研究により開発された試験法であり<sup>107), 108)</sup>、その試験法の有用性を把握すること及び試験法を確立するために必要な基礎データ取得を目的に、COLIPA 参加企業や国内の企業と Ring Study が実施された。試験法の有用性を確認するために、約 50 個の化合物に関して評価した結果、LLNA の結果との一致率は約 90% であること<sup>109)</sup>、また、5 施設での施設間再現性<sup>110)</sup> に関してアメリカ毒性学会にて報告されている。また、h-CLAT を行なう上での細胞及び血清の選択条件、前培養条件の違いによる結果への影響に関して日本動物実験代替法学会<sup>111)-113)</sup> で発表された。③U937 細胞を用いた皮膚感作性試験代替法については、L'Oréal が WELLA、LVMH との共同研究成果を European Research Group on Experimental Contact Dermatitis (ERGEDC) にて発表している<sup>114)</sup>。

なお、現時点でバリデーションの段階まで達していないものの、今後、注目に値すると考えられるいくつかの研究が報告されている。そのひとつは、アミノ基やシステイン基などを有する市販または合成ペプチドと評価化合物との結合性を評価する Peptide Reactivity Assay である<sup>115)</sup>。この方法は、評価化合物とペプチドとの結合によるペプチドの減少率から評価化合物の結合性を分析する方法で、数種類のペプチドに対する結合性から感作性のランク分類の方法も提案されている。これらの研究以外にも、細胞表面のチオール基の変化、細胞からのサイトカイン/ケモカインの産生、遺伝子の発現、そしてシグナル伝達系の変化指標とする試験報等も、国内あるいは海外の学会で発表されており、今後の研究の進展が期待される。

また、光感作性試験においては、2006 年度には、THP-1 細胞を用いた評価法が日本動物実験代替法学会で発表された<sup>116)</sup> が、代替試験法に関するバリデーション、共同研究成果の報告、新規試験法に関する研究の論文発表といった、特筆すべき動向は認められなかった。

### C-5-5 変異原性

#### ①概要

変異原性試験はその種類も多く、*in vivo*、*in vitro* 法などさまざまなものがある。代替法として開発されているものは多くないが、小核試験において、近年、*in vitro* 小核試験法が開発され、OECD ドラフトガイドラインになっている<sup>117)</sup>。また、感度の高い DNA 損傷の検出法としてコメットアッセイの開発や、変異原性試験ではないが長期発がん性試験の代替法として、形質転換試験の開発もすすめられている。

#### ②各試験法の状況

*in vitro* 小核試験 (哺乳類培養細胞を用いる小核試験) は CHL/IU などの細胞に化学物質を処理したのち培養し、その培養細胞における小核形成の存在を調べることにより、化学物質の変異原性をみるための試験である。染色体異常試験と比較して、標本作成や観察が容易で熟練を要しないこと、染色体の構造異常性だけではなく、異数性も検出できることから染色体異常試験の代替としても注目されている。

コメットアッセイは細胞をシングルセルに

分散し、アガロースゲル中に包埋して電気泳動にかけることにより、個々の細胞の DNA 損傷を検出する方法である。電気泳動した際の図からコメットアッセイと呼ばれる。テイルに傷害された DNA が存在し、テイルの量、長さなどから DNA 損傷程度がわかる。既存の変異原性試験と比較して、労力の少ないこと、高感度であること、標本観察などに熟練を要しないこと、非分裂細胞に対する変異原性を評価できること<sup>118)</sup>など、さまざまな利点から近年注目されている試験系であり、環境変異原学会や JaCVAM では試験法の標準化を検討中である<sup>119)</sup>。

ECVAM は 2003 年 4 月に実務者会議を開き、細胞形質転換法をスクリーニング法として採用することを前提にシシリアンハムスター胎児 (SHE cell) 細胞によるコロニー形成法と Balb/c 3T3 細胞によるフォーカス形成法のバリデーションスタディを行うことを決定した。また、2005 年 2 月にも第二回会議が開催され、詳細な試験実施計画が話し合われた<sup>120)</sup>。この形質転換試験は、動物実験で観察される二段階発がんを *in vitro* で再現したものであり、イニシエーション作用とプロモーション作用の両方を調べることができたため、イニシエーター及びプロモーターを探索する系として有用である。

## C-5-6 反復投与毒性

### ①概要

反復投与毒性は化学物質の長期暴露により細胞、組織あるいは多臓器に進行的に誘発される機能障害の結果で表される。この検出のため動物を用いた反復投与毒性試験では広範なエンドポイント（一般状態、体重、摂餌量、臨床検査、血液学的検査、病理組織検査など）が評価される。反復投与毒性試験で得られる標的臓器（識別・毒性）、用量関係、影響の可逆性・遅発性、無毒性量 (NOAEL) などの情報は、規制の立場からはリスクアセスメントの、また、開発の立場からは開発判断の基盤となる。欧州においては化粧品指令第 7 次改正に 2013 年までの完全代替が盛り込まれた一方で、REACH 規制導入により 30000 を超える化学物質についての試験が新たに必要となり、法的にも科学的にも受け入れ可能な代替法の開発なくしては使用動物数の著しい増加は避けられない状況にある。この反復投与毒性試験代替法の最新動向に関しては ECVAM ワークショップの 56 次レポートに詳細が述べ

られている<sup>121)</sup>。

### ②状況

反復投与毒性試験代替法は標的となる頻度が高い肝臓、腎臓、中枢神経系、肺および造血系を中心として開発が進められている。摘出臓器 (*ex vivo*) から培養細胞まで各レベルの材料の使用が試みられているが<sup>1)</sup>、これらのうちスライス培養法は *in vivo* 環境（機能・構造）をより反映しており、構成細胞間の相互作用を検討できる点や、異種動物由来スライスを比較することで種差の検討を行える利点が強調されている<sup>121)</sup>。

肝毒性に関しては、スライス培養法では細胞生存性、薬物代謝、酵素誘導、遺伝子発現、形態的变化などが毒性指標として検討されている<sup>122), 123)</sup>。肝細胞の初代培養 (*isolated hepatocyte*) は機能維持期間が短く、かつては第二相酵素による代謝の検討が困難であったが、コラーゲンを用いたサンドイッチカルチャーモデル (*sandwich culture*) あるいはコラーゲンコートスライドに肝細胞を固定させたモデルの開発でより長時間の培養が可能になり、第二相代謝を含めたより広範な代謝物の検討に道が開けた<sup>124), 125)</sup>。また、肝細胞・伊東細胞共培養法 (*Ito cell/hepatocyte co-culture*) は肝細胞障害に加えて線維化を検出可能としている<sup>126)</sup>。96well プレート上で肝細胞を初代培養する試験系は酸素供給量の調整・培養液の持続的供給を可能にしたコラーゲンゲルによる 3 次元培養法であり、ハイスループットな試験法に繋がる可能性が示されている<sup>125)</sup>。

腎毒性に関しては、特性の明らかな腎臓各部分（糸球体・尿細管など）の培養細胞株 (MDCK, LLC-PK1 など) が使用可能である<sup>127)</sup>。近位尿細管細胞を用い膜電気抵抗・色素の膜透過を測定することで、尿細管での再吸収・分泌にかかわる膜機能への影響評価が可能とされており、ハイスループットな試験法の開発に期待がもたれている<sup>127)</sup>。

肺毒性に関しては、肺スライスでは薬物代謝能<sup>8)</sup>が、II 型肺胞上皮細胞初代培養系<sup>129)-131)</sup>では界面活性物質の分泌が毒性指標になりうる可能性が示されている。気液界面培養モデル (*air-liquid interface culture*) の開発や不死化トランスジェニックマウス (*Immorto mouse*) 由来細胞 (*immortal mouse alveolar type II cell*, *iMAT II*) の使用で、より長時間の培養が可能となった<sup>132)</sup>。

中枢神経系は脳および脊髄から成る複雑なシステムであり多様な *in vitro* 試験法が研究されている。発育期脳の各部位から得たスライスは構造・機能を保ちながら比較的長期の培養（6週間～4か月）が可能であり、代替法としての応用へ期待がもたれている<sup>133)-136)</sup>。神経細胞とグリア細胞を共培養させる再凝集培養法（reaggregation culture）では、シナプスおよびミエリン形成が指標となる<sup>137), 138)</sup>。単層培養では、初代<sup>139)</sup>および株化<sup>140)-143)</sup>神経細胞（SHSY5Y, N-18, PC12, SK-N-MC）あるいは各種の初代<sup>142)</sup>および株化<sup>142), 143)</sup>グリア細胞（C6, D384）が使用されており、株化細胞では遅発性の神経毒性が検出できる可能性も示唆されている<sup>144), 145)</sup>。

造血系への影響は、長期培養開始細胞（long-term culture-initiating cell、LTC-IC）を用いた長期培養開始細胞アッセイ（long-term culture initiating assay）<sup>146)</sup>並びにヒト造血幹細胞（hematopoietic stem cells）由来 myeloid-lymphoid 開始細胞（myeloid-lymphoid initiating cell、ML-IC）を用いた myeloid-lymphoid 開始細胞アッセイ（myeloid-lymphoid initiating cell assay）<sup>147)</sup>では、myeloid および lymphoid への分化能を指標にした試験系の開発が進められている。また、ヒト造血幹細胞を用いたヒト cobblestone 領域形成細胞アッセイ（human cobblestone area forming cell (CAFC) assay）<sup>148)</sup>では顆粒球/マクロファージコロニー形成単位（production of secondary granulocyte/macrophage colony-forming units、CFU-G/M）の形成を指標として、blast コロニー形成細胞（high-proliferative-potential colony-forming cells、HPP-CFC）を用いる blast コロニー形成細胞アッセイ（blast colony-forming cell (Blast-CFC) assay）<sup>149)</sup>では巨核球・顆粒球を産生するコロニー形成細胞の形成（colony-forming cells (CFC) for the megakaryocyte and granulocytelineages）を指標として、さらにマウスあるいはヒトの造血幹細胞を用いた試験<sup>150)</sup>ではコロニー形成単位の形成（macroscopic colony formation）を指標として開発が進められている。

以上述べてきたように主要臓器を標的とした毒性を予測するための *in vitro* 試験法の開発が進む一方で、*in vitro* 試験の標準化、生体システムとしての相互作用の欠如、キネ

ティクスと代謝の欠如、リスクアセスメント（NOAEL 設定）の困難さも指摘されている<sup>1)</sup>。試験法の標準化に関しては ECVAM により GLP 並みの Good Cell Culture Practice (GCCP) の制定・導入が検討段階であり<sup>151), 152)</sup>、また、NOAEL 設定に関しては omics (genomics/transcriptomics, proteomics, metabolomics, cytomics/telomics) 技術の統合による克服に期待がもたれている<sup>153)</sup>。しかしながら、化粧品の安全性評価における 2013 年までの完全代替は現実的でなく、現時点では使用動物数削減が可能な試験法の開発を主眼とすべきであるとの合意がなされている<sup>121)</sup>。

## C-5-7 生殖毒性

### ①概要

The Joint Research Center of the European Commission は、REACH 導入により 2893 化学物質についての生殖毒性試験が、また、2135 化学物質についての発生毒性試験が必要となり、発生毒性試験および二世世代試験が占めるコストは REACH 導入による試験費用全体の 60%にも上ると試算している。法的にも科学的にも受け入れ可能な代替法の開発なくしては使用動物数の著しい増加は避けられない状況にあることから、ReProTect (EU 委員会の第 6 次 Framework Programme on Research and Development による生殖発生毒性試験のプロジェクト) が ECVAM 主導で進行中である<sup>154), 155)</sup>。生殖発生を研究するためのツールとして各種 *in vitro* 法はかねてより使用されていることから、ReProTect はこれらの試験を毒性試験およびリスクアセスメント目的に最適化することで代替法開発加速を図ろうとしている。また、ReProTect は哺乳類の生殖発生過程は複雑であり単一試験による代替は困難であると考えた。このため、生殖発生過程の 3 領域（受（授）精能、着床、出生前発生）および横断研究（センサーテクノロジー、QSAR、体内動態、トキシコゲノミクス、受容体相互作用）をそれぞれのワークパッケージ (W.P.) として個別に試験法開発を進めており、有望な試験法については試験法最適化、SOP 作成、施設内・少数施設間バリデーションを経て公式バリデーションに進むことを期待している。ECVAM では試験法の開発および最適化の一助として 150 以上の陽性対照物質を選定し、最終的には *in vitro/in silico* 試験のバッテリーによる代替を目指している<sup>156)</sup>。

## ②状況

以下に ReProTect で紹介されている試験法の概要・状況を W.P. 順に示す<sup>156)</sup>。

受(授)精能 (W.P. 1) はさらに W.P. 1.1~1.5 に分けられる。成熟精子/精子形成過程への影響 (W.P. 1.1) に関して、精子染色質構造アッセイ (Sperm chromatin structure assay) では染色質の変性が、精子ニュートラルコメットアッセイ (Neutral comet assay in sperm) では DNA の損傷が、また精子毒性試験 (Bovine spermatozoa cytotoxicity test) では運動性の抑制が、いずれもウシ精子を用いて検討されている。精巣間細胞への影響 (W.P. 1.2) に関しては、マウス精巣間細胞 (BLT1) を用い細胞毒性およびプロジェステロン (P4) ・テストステロン産生を指標とする精巣間細胞毒性試験 (Leydig cell tox test) が検討されている。セルトリ細胞への影響 (W.P. 1.3) に関しては、ラット精巣から分離したセルトリ細胞および培養ラットセルトリ細胞 (SerW3) を用いた細胞毒性試験および Inhibin B 分泌を指標とする精巣セルトリ細胞毒性試験 (Sertoli cell assay) が検討されている。(受精) 卵形成過程への影響 (W.P. 1.4) は、ウシ卵細胞を用い分裂中期像 (卵細胞成熟) ・前核形成 (受精) ・胞胚発生を指標とする卵母細胞/胚を用いた代替法 (Bovine oocytes/embryos for the development of alternative tests) およびマウス胚を用いて着床前胚発生 (生存・発育) を指標にしたマウス胚アッセイ (Mouse embryo assay) が検討されている。顆粒層細胞/莖膜細胞・ステロイド産生への影響 (W.P. 1.5 および W.P. 1.6) は、不死化マウス顆粒層細胞を用いて FSH シグナル伝達 (cAMP 蓄積) ・ステロイド産生 (P4・E2) を指標とした FSH シグナル伝達およびステロイド産生試験 (FSH-signaling and steroidogenesis in immortalized mouse granulosa cells) が検討されている。さらに、マウス卵巣 (卵胞) を用いて卵胞形成 (卵胞の生存・分化・排卵刺激への反応) ・ステロイド産生 (アンドロステンジオン/テストステロン・E2・P4・その他) および卵細胞形成 (形態・核成熟度) を指標とする卵胞バイオアッセイ (Follicle bioassay) が紹介されているが、各試験ともプレバリデーションの段階である。

着床に関しては 2006 年 7 月に、標的臓器で

ある子宮 (W.P. 2.1) および胎盤 (W.P. 2.2) それぞれを対象として研究が開始された。W.P. 2.1 では、ヒト子宮内膜内皮細胞 (Human endometrial endothelial cells) の初代培養を用いて細胞増殖・生存性・内皮細胞マーカーを測定するヒト子宮内膜内皮細胞試験、増殖期・分泌期のヒト子宮内膜を用いて各種のマーカー (PRa, ERa, LIF, avb3, calcitonin, IGF-Binding, PGDH, CRH-receptor 1, VEGF-A, KDR) を測定するヒト子宮内膜移植培養 (Human endometrial explants) が検討されている。W.P. 2.2 では、妊娠第 1 三半期のヒト絨毛膜絨毛における細胞増殖・分化・分泌 (ホルモン、サイトカイン、成長因子) を測定するヒト絨毛膜絨毛移植培養法 (In vitro test on chorionic villous explants from first trimester human placenta) ・並びにトロポブラスト由来培養細胞 (BeWo, JEG-3, and HTR8/Svneo) における細胞増殖・ホルモン分泌 (b-hCG) を測定するトロポブラスト由来培養細胞を用いた in vitro 試験 (In vitro test on trophoblast-derived cell line cultures) が検討されている。さらに、ヒト胎盤の胎児側および母体側両側を灌流するヒト胎盤透過性 (両側灌流法) (Placental transport in human dual perfusion system) では QSAR 的アプローチの一助となるデータを提供できる可能性に期待がもたれているが、各試験ともプレバリデーションの段階である<sup>156)</sup>。

出生前発生に関しては、発生初期 (W.P. 3.1) および発生後期 (W.P. 3.2) に分けて検討されている。発生初期 (W.P. 3.1) の影響は、マウス ES 細胞 (D3) およびマウス線維芽細胞 (3T3) を用い、ES 細胞の心筋細胞への分化抑制、3T3 細胞における細胞毒性および ES 細胞における細胞毒性の 3 項目を指標とする胚性幹細胞試験 (Embryonic Stem Cell Test, EST) で検討されている。発生後期 (W.P. 3.2) の影響は妊娠 10 日のラット胚を用い、約 20 の発育・発達指標を評価するラット全胚培養法 (whole-embryo culture test, WEC test) で検討されている。両試験とも ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) によりバリデーション済みであるが、前者では中枢神経系および骨格系への分化を含めてさらに安定したバイオマーカーの探索ならびに代謝活性化の組み込みに力が注がれている。なお、EST についてはドイツのベルリン自由大学において技術トランスファーの

ための研修も実施されている。

上記三領域における代替法開発をサポートする横断研究 (W.P. 4) はさらに W.P. 4.1~4.5 に分けられる。センサーテクノロジー (W.P. 4.1) ではマウス ES 細胞イオンチャネルにおける活動電位をマイクロアレイ電極 (Microelectrode array) を用いて測定する方法が試みられている。また、構造活性相関 (W.P. 4.2) に関する現段階の主題はステロイドホルモンの受容体への結合・転写活性化、血液精巣閉門透過性であり、将来的には胎盤透過性へのデータ提供を視野に入れている。体内動態 (W.P. 4.3) では、マウス悪性奇形腫細胞 (F9) およびマウス胚性幹細胞 (D3) 培養系に S9mix とラット肝細胞を加え、各細胞の分化を評価する代謝催奇形性試験 (Metabolic teratogenicity test) が検討されている。アレイテクノロジー (W.P. 4.4) では、各種ホルモン受容体を組み込んだ乳腺あるいは前立腺由来細胞での遺伝子発現が、受容体相互作用 (W.P. 4.5) では、男性あるいは女性ホルモン応答エレメントとレポータ遺伝子 (ルシフェラーゼ) を安定発現させた各種培養細胞を使用した試験系 (MELN、Androgen receptor-mediated transactivation assay in PALM cells、AR CALUX®、ERalpha CALUX®、Recombinant human estrogen receptor- $\alpha$  binding assay、Recombinant rat androgen receptor binding assay) が検討されている。各試験ともプレバリデーションの段階であるが、このワークパッケージは OECD によるバリデーションに組み込まれる予定である<sup>156)</sup>。

#### C-5-8 経皮吸収性

経皮吸収試験は化粧品、医薬部外品および医薬品等の皮膚への適用による角質、表皮および真皮への透過ならびに全身的暴露を評価するために行われる試験である。経皮吸収試験代替法については、動物 (主にラットおよびブタ) またはヒト摘出皮膚を用いた透過拡散セルによる *in vitro* 試験法 (OECD TG428)<sup>157)</sup> が実験動物を用いた *in vivo* 試験 (OECD TG427)<sup>158)</sup> と同時に標準化されている。現在、このガイドラインが経皮吸収試験代替法の中心的な役割を担っており、Scientific Committee on Consumer Products (SCCP) によって示された“化粧品成分の皮膚吸収における *in vitro* 評価基準” (2006 年 3 月アップデート) においても、原則的に TG428 の遵守が求められている<sup>159)</sup>。従って、経皮吸収試

験における代替法開発は、TG428 をベースとした *in vitro* 試験に用いる動物およびヒト摘出皮膚の代替材料 (培養皮膚、生体膜および人工膜) の利用およびその妥当性の評価である。

代替材料としてもっとも開発がすすんでいるものは再構築ヒト表皮 (RHE) であり、ドイツで行われたプレバリデーションスタディの結果が 2006 年に報告されている<sup>160)</sup>。OECD 標準物質であるカフェインとテストステロンを用いて動物およびヒト皮膚と比較した結果、RHE はヒト皮膚に比べて、経皮吸収が過大評価されるものの、高い施設内・施設間再現性が得られており、現在、バリデーションスタディが進められている。

新規な代替材料としてはウシ乳房皮膚<sup>161)</sup> および脱皮ヘビ皮膚<sup>162)</sup> が報告されている。ウシ乳房皮膚は入手が困難となってきたブタ皮膚の代替材料として期待されており、4 種類の化合物を用いて検討した結果、ウシ乳房皮膚の透過性はブタおよびヒト皮膚よりもやや低い傾向にあったが、バリア強度については違いがないことが確認されている。また、脱皮ヘビ皮膚についてはヒト皮膚に比べて、親水性物質の透過性は低いものの、親油性物質については同等であり、皮膚の厚さと脂質含量に違いはなく、親油性化合物のバリア膜として有用性が示唆されている。

人工膜については化合物の受動ヒト皮膚透過性を迅速評価する人工膜透過性アッセイ (PAMPA)<sup>163)</sup> や多孔性の基板に適用された合成角層脂質 (コレステロール、遊離脂肪酸、および特定のセラミド) からなる角質層代替物 (SCS)<sup>164)</sup> が提案されている。いずれも、角質バリア特性を模倣しており、ヒト皮膚透過性を予測するモデルとしての有用性が報告されている。SCS については脂質組成を変更することにより、疾病皮膚のスクリーニングモデルとしての可能性も示唆されている。これまでに行われたシリコンラバーを用いる経皮透過性試験の施設間・施設内バリデーションでは、施設間および施設内誤差が大きく、実用化されるまでには多くの改良の余地を残しており<sup>165)</sup>、生体皮膚の特性を反映した人工膜の研究開発と代替法への利用が期待される。その他、拡散透過セルを用いない経皮吸収試験代替法に関しては、構造活性相関 (QSAR) による経皮吸収予測に関する方法がいくつか提案されており、①CODESSA PRO、②理論上の分子記述子の大きなプールを使ったニューラル

ネットワークモデリングおよび③断片記述子を基にした ISIDA モデリングの有用性が確認されている<sup>166)</sup>。反復投与による経皮吸収試験については限られた試験期間以内の反復投与でデザインされたいくつかの試験法はあるが、現在、標準化された反復局所投与に利用できる *in vitro* 試験法はなく、代謝を組み込んだ皮膚吸収/透過に利用できる *in vitro* 試験法もない。また、ヒトボランティアによる皮膚吸収試験は、化粧品原料や化粧品製品の低い毒性の場合において行うことができるが、利用できるヒトのデータはほとんどないのが実情である<sup>167)</sup>。

#### C-5-9 小括

本年度の代替法の開発と評価に関する状況を安全性評価項目ごとにとりまとめた。その結果、本年度は特筆すべき変化はなかったものと考えられた。

#### D. 結論

本年度の代替法の開発と評価に関する進展を概観すると、新規試験法のガイドライン化の観点では、特筆すべき変化はなかった。しかし、「代替法の 3 Rs」のグローバルな認知は着実に進行した年と考えられた。本邦においては、JaCVAM の稼働、「3Rs の原則」が記載された改正・動物愛護管理法が施行された。また、EU では 2005 年の「3Rs 宣言」に基づき EPAA が 2006 年 5 月にアクションプログラムを公表し、さらに 12 月に年次大会を開催するなどその活動を開始している。ECVAM は皮膚刺激性試験代替法と眼刺激性試験代替法の評価を着実に進行させている。

一方、米国における ICCVAM は、2006 年 3 月に 4 種眼刺激性試験代替法の最終バックグラウンドレビュー文書を公表している。

2003 年 3 月 11 日に公布された「化粧品指令第 7 次改正」において段階的に設定されたタイムリミットである 2009 年及び 2013 年が迫りつつあり、さらに 2007 年 6 月 1 日からの REACH の施行もあり、今後ますます代替法開発、評価、活用が促進されるものと考えられる。

代替法の開発と評価は、非常に長い年月を要するためガイドラインとして文書化された場合は別として、単年度では明確にその全貌を捉えることは困難である。したがって、本邦における動物実験代替法の開発と評価を推

進し、さらには今後の国際協調への参考情報とするためには、関連する国際情勢の調査と解析を継続して実施し、積み重ねていく必要があると考える。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 参考文献

- 1) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003, Official Journal of the European Union, L66/26, 2003
- 2) CTPA News update, February 6, 2003.
- 3) CTPA News update, March 3, 2003.
- 4) [http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics/html/cosm\\_animal\\_test.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics/html/cosm_animal_test.htm)
- 5) <http://pharmacos.eudra.org/F3/cosmetic/AnimalTest.html>
- 6) <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
- 7) [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/sccp\\_opinions\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/sccp_opinions_en.htm)
- 8) [http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/index_en.htm)
- 9) [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach\\_intro.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_intro.htm)
- 10) [http://ec.europa.eu/enterprise/reach/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/reach/index_en.htm)
- 11) <http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=MEMO/06/488&format=HTML&aged=0&language=EN&guiLanguage=fr>
- 12) [http://ec.europa.eu/enterprise/reach/docs/reach/reach\\_in\\_brief\\_revised\\_0612\\_12.pdf](http://ec.europa.eu/enterprise/reach/docs/reach/reach_in_brief_revised_0612_12.pdf)
- 13) <http://ecb.jrc.it/reach/>
- 14) <http://ecb.jrc.it/testing-methods/>
- 15) De Silva, O. et al., The COLIPA strategy for the development of *in vitro* alternatives, ALTEX, 22, Special Issue, Abstracts 5th World Congress 2005, 255, 2005
- 16) Basketter, D. et al., The COLIPA strategy for the development of *in vitro* alternatives: Skin sensitization, ALTEX, 22, Special Issue, Abstracts 5th World Congress 2005, 139, 2005
- 17) <http://allergo.lyon.inserm.fr/ERGECD/index.htm>
- 18) <http://www.bfr.bund.de/cd/1591>

- 19) <http://www.nc3rs.co.uk/>
- 20) <http://www.frame.org.uk/index.htm>
- 21) <http://www.forschung3r.ch/en/information/>
- 22) <http://www.nca-nl.org/>
- 23) <http://www.estiv.org/>
- 24) <http://www.zet.or.at/MEGAT/english/introenglish.htm>[http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach\\_intro.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_intro.htm)
- 25) <http://iccvam.niehs.nih.gov/>
- 26) CTFA, Tech/Reg Notes, Volume 20, Number 7, December 2006
- 27) [http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_2349687\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html)
- 28) <http://www.oecd.org/dataoecd/49/55/37531918.pdf>
- 29) 小坂七重ら, In vitro 皮膚感作性試験: h-CLAT(human cell line activation test)の日本における共同開発(第2報)-適切なTHP-1細胞の選択基準の検討, 第20回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 89, 2006.
- 30) 菌さき子ら, In vitro 皮膚感作性試験: h-CLAT(human cell line activation test)の日本における共同開発(第3報)-血清の影響, 第20回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 91, 2006.
- 31) 水野誠ら, In vitro 皮膚感作性試験: h-CLAT(human cell line activation test)の日本における共同開発(第4報)-前培養に関する条件検, 第20回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 93, 2006.
- 32) 森眞輝ら, In vitro 光毒性試験の動物実験代替法としてのYeast-RBCアッセイの開発の提案, 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集, 84, 2004
- 33) 田中憲穂ら, 酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験を用いた光毒性: バッテリーのバリデーション及び評価委員会での検討中間報告, 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集, 85, 2004
- 34) 吉村功ら, 酵母-赤血球試験の光毒性試験代替法としてのバリデーション研究, 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集, 86, 2004
- 35) 小島肇夫ら, 皮膚感作性試験の代替法-LLNA-DA法と他の代替試験法について-, 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集, 95, 2004.
- 36) 小島肇夫, JaCVAMの昨今の動向, 第20回日本動物実験代替法学会学術大会講演要旨集, 41, 2006.
- 37) <http://www.env.go.jp/>
- 38) <http://www.mext.go.jp/>
- 39) <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2006/03/s0308-6c.html>
- 40) <http://www.nedo.go.jp/>
- 41) Gribaldo, L. et al., Ruhdel 3.1. Acute toxicity. Alternative (Non-Animal) Method for Cosmetics Testing: Current Status and Future Prospects, ATLA, 33, Suppl. 1, 27, 2005
- 42) Gennari, A. et al., ECVAM Workshop 50. Strategies to replace in vivo acute systemic toxicity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 50., ATLA, 32, 437, 2004
- 43) Cytotoxicity (MEIC). Summary. September 2000. National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) (<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invidocs/MEICSumm.pdf>)
- 44) Organisation for Economic Co-operation and Development. Chemicals Testing-Guidelines. ([http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_2349687\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html))
- 45) Clemedson, C. et al., Development of an in vitro test battery for the estimation of acute human systemic toxicity: An outline of the EDIT project. Evaluation-guided Development of New In Vitro Test Batteries. ATLA, 30, 313, 2002
- 46) Ekwall, B. et al., EDIT - a New International Multicenter Programme to Develop and Evaluate Batteries of In Vitro Tests for Acute and Chronic Systemic Toxicity. ATLA, 27, 339, 1999
- 47) ACuteTox - Research Project For Alternative Testing. Welcome to ACuteTox. (<http://www.acutetox.org/>)



- 48) A-Cute-Tox project an Integrated Project under the EU 6FP with the aim to optimize and pre-validate an in vitro test strategy for predicting human acute toxicity. European Society of Toxicology in vitro (ESTIV) Newsletter 18, 2005
- 49) Federal Register, 69, 61504, 2004
- 50) In Vitro Cytotoxicity Validation Study (<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ivcytoval.htm>)
- 51) TEST METHOD PROTOCOL for the BALB/c 3T3 Neutral Red Uptake Cytotoxicity Test. A Test for Basal Cytotoxicity for an In Vitro Validation Study Phase III. November 4, 2003  
(<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invdocs/phIIIprot/3t3phIII.pdf>)
- 52) TEST METHOD PROTOCOL for the Normal Human Keratinocyte (NHK) Neutral Red Uptake Cytotoxicity Test. A Test for Basal Cytotoxicity for an In Vitro Validation Study Phase III. November 4, 2003  
(<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invdocs/phIIIprot/nhkphIII.pdf>)
- 53) ICCVAM-NICEATM Workshop Lectures and Poster Presentations at the 5th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Berlin, Germany, August 21-25, 2005  
(<http://iccvam.niehs.nih.gov/meetings/5wcprnt.htm>)
- 54) Casati, S. et al, Preliminary (Phase I) Results of a Validation Study to Evaluate the Reliability and Relevance of Two In Vitro Cytotoxicity Assays for Predicting Rodent and Human Acute Systemic Toxicity, 41st Congress of the European Societies of Toxicology EUROTOX 2003, 2003
- 55) Strickland, J. A. et al., Data Collection and Analysis Systems for an In Vitro Cytotoxicity Validation Study, Society of Toxicology 43rd Annual Meeting, The Toxicologist, 50, 2004
- 56) Stokes, W. S. et al., Results of the final phase of a validation study to evaluate in vitro cytotoxicity assays for estimating rodent acute systemic toxicity, ALTEX, 22, Special Issue, Abstracts 5th World Congress 2005, 196, 2005
- 57) Basketter, D. A. et al., Predictive testing in contact dermatitis: irritant dermatitis, Clinics in Dermatology, 15, 637, 1999
- 58) York, M. et al., Evaluation of a human patch test for the identification and classification of skin irritation potential, Contact Dermatitis, 34, 204, 1996
- 59) Van de Sandt, J. et al., The use of human keratinocytes and human skin models for predicting skin irritation, ATLA, 27, 723, 1999
- 60) Sonoda, I. et al., A prevalidation study for three-dimensional cultured human skin models as alternatives to skin irritation testing, Altern. Animal Test. Experiment., 8, 91, 2002
- 61) Botham, P. A., The validation of in vitro methods for skin irritation, Toxicol. Letters, 149, 387, 2004
- 62) Fentem, J. H. et al., Update on the validation and regulatory acceptance of alternative tests for skin corrosion and irritation, ATLA, 32, Suppl. 1, 683, 2004
- 63) OECD guidelines for testing of chemicals, 431, Paris, OECD, 2004
- 64) 薬事・食品衛生審議会・毒物劇物部会議事録  
(<http://mhlw.go.jp/shingi/2004/10/txt/s1005-1.txt>)
- 65) OECD guidelines for testing of chemicals, 430, Paris, OECD, 2004
- 66) NIEHS, IH publication, No. 99-4495, 1999
- 67) OECD guidelines for testing of chemicals, Proposal for a draft new guideline 435, 2004
- 68) Directive 2001/59/EC of 6 August 2001, Official Journal of the European Union, L225/1, 2001
- 69) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 432, Paris, OECD, 2004
- 70) 大野 泰雄ら, Balb/c 3T3 細胞を用い Neutral red 取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価結果報告, Altern. Animal Test. Experiment., 10, 50, 2004
- 71) Spielmann, H. et al., In vitro phototoxicity testing: The report and

- recommendations of ECVAM Workshop 2., ATLA, 22, 314, 1994
- 72) 森眞輝ら, In vitro 光毒性試験の動物実験代替法としての Yeast-RBC アッセイの開発の提案, 第 33 回日本環境変異原学会第 18 回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集, 84, 2004
- 73) 田中憲穂ら, 酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験を用いた光毒性: バッテリーのバリデーション及び評価委員会での検討中間報告, 第 33 回日本環境変異原学会第 18 回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集, 85, 2004
- 74) 吉村功ら, 酵母-赤血球試験の光毒性試験代替法としてのバリデーション研究, 第 33 回日本環境変異原学会第 18 回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集, 86, 2004
- 75) 石井宏, 藤城亮, 滝ノ上由文, 加納聡, 藤堂浩明, 杉林堅次 “培養細胞を用いた皮膚刺激性評価”, 第 20 回日本動物実験代替法学会, 2006
- 76) 浜島文泰, 加藤雅一, 伊藤有紀, 久保健太郎, 重田友美, 梶賢一郎, “メラノサイトを共培養した 3 次元皮膚モデル LabCyte MELANO-MODEL の基礎的性質”, 第 20 回日本動物実験代替法学会, 2006.
- 77) 加藤雅一, 浜島文泰, 伊藤有紀, 久保健太郎, 梶賢一郎, 中村未央, 篠田伸介 “OECD TG431 に基づく皮膚腐食性私権でのヒト 3 次元培養皮膚モデル「LabCyte EPI-MODEL」の評価”, 第 20 回日本動物実験代替法学会, 2006.
- 78) 周玉, 石橋麻子, 藤川真章, 崎村雅憲, 山田弘, 堀井郁夫, “化合物の光毒性予測における化学計算のアプローチ”, 第 20 回日本動物実験代替法学会, 2006.
- 79) 寒水孝司, 白石亜矢子, 兵頭洋平, 浜田知久馬, 吉村功, “皮膚刺激性試験代替法における ET50 値推定法”, 第 20 回日本動物実験代替法学会, 2006.
- 80) 北山雅也, 柏木哲, 桜井知子, Christopher P Sambuco, “メチルパラベンの光毒性試験”, 第 20 回日本動物実験代替法学会, 2006.
- 81) 藤川真章, 周玉, 山田弘, 堀井郁夫, “In vitro 3T3 Neutral Red Uptake (NRU) 光毒性試験法のスルートップ向上に関する検討”, 第 33 回日本トキシコロジー学会, 2006.
- 82) 周玉, 石橋麻子, 崎村雅憲, 藤川真章, 山田弘, 堀井郁夫, “化合物光毒性評価への化学計算的なアプローチ”, 第 33 回日本トキシコロジー学会, 2006.
- 83) 今井教安, 大谷しのぶ, 谷川浩子, 岡本裕子, “酵母光育成阻害試験法における拡散の影響”, 第 33 回日本トキシコロジー学会, 2006.
- 84) Kay, J. H. and Calandra, I. C., Interpretation of eye irritation tests, J. Soc. Cosmetic Chem., 13, 281, 1962
- 85) <http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Testing-Methods/ANNEXV/B05web2004.pdf>
- 86) [http://europa.eu.int/comm/health/ph\\_risk/committees/sccp/documents/out173\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/health/ph_risk/committees/sccp/documents/out173_en.pdf)
- 87) Gilleron, L. et al., Evaluation of a modified HET-CAM assay as a screening test for eye irritancy, Toxicol. in Vitro, 10, 431, 1996
- 88) Ohno, Y. et al., Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests, Toxicol. in Vitro, 13, 73, 1999
- 89) Hagino, S. et al., Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (2) Chorioallantoic membrane (CAM) test, Toxicol. in Vitro, 13, 99, 1999
- 90) Tani, N. et al., Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (8) Evaluation of cytotoxicity tests on SIRC cells, Toxicol. in Vitro, 13, 175, 1999
- 91) Chiba, K. et al., Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (9) Evaluation of cytotoxicity test on HeLa cells, Toxicol. in Vitro, 13, 189, 1999
- 92) Okumura, H. et al., Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (10) Evaluation of cytotoxicity test on CHL cells, Toxicol. in Vitro, 13, 199, 1999
- 93) Uchiyama, T. et al., Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (7) Evaluation of cytotoxicity test by Corneal PackR, Toxicol. in Vitro, 13, 163, 1999
- 94) Okamoto, Y. et al., Interlaboratory

- validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (3) Evaluation of the haemolysis test, *Toxicol. in Vitro*, 13, 115, 1999
- 95) Ohuchi, J. et al., Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (6) Evaluation of MATREXTM, *Toxicol. in Vitro*, 13, 153, 1999
- 96) Matsukawa, K. et al., Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (11) Evaluation of EYETEXTM, *Toxicol. in Vitro*, 13, 209, 1999
- 97) Hatao, M. et al., Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (4) Evaluation of haemoglobin denaturation test, *Toxicol. in Vitro*, 13, 125, 1999
- 98) Expert Panel Evaluation of the Current Validation Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants (<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocudocs/EPreport/ocureport.htm>)
- 99) Burton, P. et al., The in vitro assessment of severe eye irritants, *Food. Chem. Toxicol.*, 19, 471, 1981
- 100) Weil, C. S. and Scala, R. A., Study of intra-and inter-laboratory variability in the results of rabbit eye and skin irritation tests, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 19, 276, 1971
- 101) Luepke, N. P., Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential, *Food. Chem. Toxicol.*, 23, 287, 1985
- 102) Gautheron, P. et al., Bovine corneal opacity and permeability test: an in vitro assay of ocular irritancy, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18, 442, 1992
- 103) 大森崇ら 皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA法)バリデーション研究, 第20回日本動物実験代替法学会要旨集, 95-96
- 104) 大森崇ら Stimulation Indexの施設間再現性を評価する指標, 第20回日本動物実験代替法学会要旨集, 115-116
- 105) 兵頭洋平ら 動物実験代替法のバリデーションにおける transferabilityの統計的評価法に関する研究, 第20回日本動物実験代替法学会要旨集, 117-118
- 106) 高沼正幸ら 動物実験代替法バリデーション研究における被検物質割付の最適性に関する検討, 第20回日本動物実験代替法学会要旨集, 119-120
- 107) Ashikaga, T. et al., (2006) Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicology in Vitro*, 20, 763-773.
- 108) Sakaguchi, H. et al., (2006) Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicology in Vitro*, 20, 774-784
- 109) Sakaguchi, H. et al., (2006) Predicting and classification of allergic potential using an in vitro skin sensitization test: human cell Line Activation Test (h-CLAT). *The Toxicologist*, 90, 466. abstract # 2279.
- 110) Ryan C. (2006) Ring Trials of dendritic cells surrogate cell lines. *The Toxicologist*, 90, 233. abstract # 1144.
- 111) 小坂七重ら (2006) In vitro皮膚感作性試験:h-CLAT(human Cell Line Activation Test)の日本における共同研究(第2報)-適切な THP-1細胞の選択基準の検討-, 第20回日本動物実験代替法学会要旨集, 89-90.
- 112) 菌さき子ら (2006) In vitro皮膚感作性試験:h-CLAT(human Cell Line Activation Test)の日本における共同研究(第3報)-血清の影響-, 第20回日本動物実験代替法学会要旨集, 91-92.
- 113) 水野誠ら (2006) In vitro皮膚感作性試験:h-CLAT(human Cell Line Activation Test)の日本における共同研究(第4報)-前培養に関する条件検討-, 第20回日本動物実験代替法学会要旨集, 93-94.
- 114) Jean-Marc Ovigne et al., (2006) U937/CD86 in vitro skin sensitization potential predictive test: a harmonized and transferable protocol - moving towards a COLIPA European interlaboratory ring study. (要旨無し)

- <http://allergo.lyon.inserm.fr/ERGECD/program.htm>
- 115) Gerberick, G.F. et al., (2004) Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens, *Toxicological Sciences*, 81, 332-343.
- 116) 穂谷昌利ら ヒト単球由来細胞株を用いた光感作性試験代替法の開発, 第20回日本動物実験代替法学会要旨集, 85-86.
- 117) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE 487: In Vitro Micronucleus Test, <http://www.oecd.org/dataoecd/33/22/37865944.pdf>
- 118) Fairbairn DW. et al., (1995) The comet assay: a comprehensive review., *Mutat Res.*, 339(1):37-59.
- 119) 小島 肇 JaCVAM の昨今の動向、第20回日本動物実験代替法学会要旨集, 41-42.
- 120) 梅田誠ら 発がん性試験の代替法: ECVAM での prevalidation Study の現状, 第19回日本動物実験代替法学会要旨集, 46-47.
- 121) Prieto P, Baird AW, Blaauboer BJ, Castell Ripoll JV, Corvi R, Dekant W, Dietl P, Gennari A, Gribaldo L, Griffin JL, Hartung T, Heindel JJ, Hoet P, Jennings P, Marocchio L, Noraberg J, Pazos P, Westmoreland C, Wolf A, Wright J, Pfaller W. The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. *Altern Lab Anim.* 2006 Jun;34(3):315-41.
- 122) Vickers AE, Fisher RL., Organ slices for the evaluation of human drug toxicity. *Chem Biol Interact.* 2004 Nov 1;150(1):87-96.
- 123) Behrsing HP, Vickers AE, Tyson CA. Extended rat liver slice survival and stability monitored using clinical biomarkers. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Dec 5;312(1):209-13.
- 124) Bader A, Borel Rinkes IH, Closs EI, Ryan CM, Toner M, Cunningham JM, Tompkins RG, Yarmush ML. A stable long-term hepatocyte culture system for studies of physiologic processes: cytokine stimulation of the acute phase response in rat and human hepatocytes. *Biotechnol Prog.* 1992 May-Jun;8(3):219-25.
- 125) Gebhardt R, Hengstler JG, Muller D, Glockner R, Buening P, Laube B, Schmelzer E, Ullrich M, Utesch D, Hewitt N, Ringel M, Hilz BR, Bader A, Langsch A, Koese T, Burger HJ, Maas J, Oesch F. New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. *Drug Metab Rev.* 2003 May-Aug;35(2-3):145-213.
- 126) Loreal O, Levavasseur F, Fromaget C, Gros D, Guillouzo A, Clement B. Cooperation of Ito cells and hepatocytes in the deposition of an extracellular matrix in vitro. *Am J Pathol.* 1993 Aug;143(2):538-44.
- 127) Duff T, Carter S, Feldman G, McEwan G, Pfaller W, Rhodes P, Ryan M, Hawksworth G. Transepithelial resistance and inulin permeability as endpoints in in vitro nephrotoxicity testing. *Altern Lab Anim.* 2002 Dec;30 Suppl 2:53-9.
- 128) Umachandran M, Howarth J, Ioannides C. Metabolic and structural viability of precision-cut rat lung slices in culture. *Xenobiotica.* 2004 Aug;34(8):771-80.
- 129) Dobbs LG, Pian MS, Maglio M, Dumars S, Allen L. Maintenance of the differentiated type II cell phenotype by culture with an apical air surface. *Am J Physiol.* 1997 Aug;273(2 Pt 1):L347-54.
- 130) Gindorf C, Steimer A, Lehr CM, Bock U, Schmitz S, Haltner E. Marker transport across biological barriers in vitro: comparison of cell culture models for the gastrointestinal barrier, the blood-brain barrier and the alveolar epithelium of the lung. *ALTEX.* 2001;18(3):155-64.
- 131) Dietl P, Haller T, Mair N, Frick M. Mechanisms of surfactant exocytosis in alveolar type II cells in vitro and in vivo. *News Physiol Sci.* 2001 Oct;16:239-43.
- 132) Jennings P, Bertocchi C, Frick M, Haller T, Pfaller W, Dietl P. Ca<sup>2+</sup> induced surfactant secretion in alveolar type II cultures isolated from the H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Cell Physiol Biochem.*

- 2005;15(1-4):159-66.
- 133) Adamchik Y, Frantseva MV, Weisspapir M, Carlen PL, Perez Velazquez JL. Methods to induce primary and secondary traumatic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2000 Apr;5(2):153-8.
- 134) Noraberg J, Gramsbergen JB, Fonnum F, Zimmer J. Trimethyltin (TMT) neurotoxicity in organotypic rat hippocampal slice cultures. *Brain Res.* 1998 Feb 9;783(2):305-15.
- 135) Pringle AK, Schmidt W, Deans JK, Wulfert E, Reymann KG, Sundstrom LE. 7-Hydroxylated epiandrosterone (7-OH-EPIA) reduces ischaemia-induced neuronal damage both in vivo and in vitro. *Eur J Neurosci.* 2003 Jul;18(1):117-24.
- 136) Noraberg J. Organotypic brain slice cultures: an efficient and reliable method for neurotoxicological screening and mechanistic studies. *Altern Lab Anim.* 2004 Oct;32(4):329-37.
- 137) Honegger P, Monnet-Tschudi F. Aggregating neural cell cultures. In *Protocols for neuro cell culture*, (ed. S. Fedoroff & A. Richardson), 3rd edn, pp. 199-218, Totowa, NJ, USA: Humana Press.
- 138) Zurich MG, Lengacher S, Braissant O, Monnet-Tschudi F, Pellerin L, Honegger P. Unusual astrocyte reactivity caused by the food mycotoxin ochratoxin A in aggregating rat brain cell cultures. *Neuroscience.* 2005;134(3):771-82.
- 139) Schmuck G, Ahr HJ, Schluter G. Rat cortical neuron cultures: an in vitro model for differentiating mechanisms of chemically induced neurotoxicity. In *Vitro Mol Toxicol.* 2000 Spring;13(1):37-50.
- 140) Norenberg, M.D. Astrocytosis. In *The Role of Glia in neurotoxicology* (ed. M. Aschner & H.K. Kimelberg), pp. 93-110, Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- 141) Goldoni M, Vettori MV, Alinovi R, Caglieri A, Ceccatelli S, Mutti A. Models of neurotoxicity: extrapolation of benchmark doses in vitro. *Risk Anal.* 2003 Jun;23(3):505-14.
- 142) Deng W, Poretz RD. Oligodendroglia in developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology.* 2003 Mar;24(2):161-78.
- 143) Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia.* 2002 Nov;40(2):140-55.
- 144) Forsby A, Pilli F, Bianchi V, Walum E. Determination of critical cellular neurotoxic concentrations in human neuroblastoma SH-SY5Y cell cultures. *Altern Lab Anim.* 1995 23 800-811.
- 145) Schmuck G, Ahr H. Improved in vitro method for screening organophosphate-induced delayed polyneuropathy. *Toxicology in vitro.* 1997 11:263-270.
- 146) Lemieux ME, Rebel VI, Lansdorp PM, Eaves CJ. Characterization and purification of a primitive hematopoietic cell type in adult mouse marrow capable of lymphomyeloid differentiation in long-term marrow "switch" cultures. *Blood.* 1995 Aug 15;86(4):1339-47.
- 147) Punzel M, Wissink SD, Miller JS, Moore KA, Lemischka IR, Verfaillie CM. The myeloid-lymphoid initiating cell (ML-IC) assay assesses the fate of multipotent human progenitors in vitro. *Blood.* 1999 Jun 1;93(11):3750-6.
- 148) Ploemacher RE, van der Sluijs JP, Voerman JS, Brons NH. An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood.* 1989 Dec;74(8):2755-63.
- 149) McNiece IK, Williams NT, Johnson GR, Kriegler AB, Bradley TR, Hodgson GS. Generation of murine hematopoietic precursor cells from macrophage high-proliferative-potential colony-forming cells. *Exp Hematol.* 1987 Oct;15(9):972-7.
- 150) Eckmann L, Freshney M, Wright EG, Sproul A, Wilkie N, Pragnell IB. A novel in vitro assay for murine haematopoietic stem cells. *Br J Cancer Suppl.* 1988 Dec;9:36-40.
- 151) Hartung T, Balls M, Bardouille C, Blanck O, Coecke S, Gstraunthaler G,

- Lewis D; ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force. Good Cell Culture Practice. ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1. Altern Lab Anim. 2002 Jul-Aug;30(4):407-14.
- 152) Sandra C, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, Hay R, Merten OW, Price A, Schechtman L, Stacey G, Stokes W, Patlewicz G; Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. Altern Lab Anim. 2005 Jun;33(3):261-87.
- 153) Heijne WH, Kienhuis AS, van Ommen B, Stierum RH, Groten JP. Systems toxicology: applications of toxicogenomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics in toxicology. Expert Rev Proteomics. 2005 Oct;2(5):767-80.
- 154) Prieto P. et al., Subacute and subchronic toxicity. ATLA 33, Suppl. 1, 109-116. , 2005.
- 155) Cosmetics technical report ECVAM contribution, Subacute and subchronic toxicity, p 5, 2005.
- 156) <http://www.reprotect.eu>
- 157) OECD guidelines for testing chemicals, 428, Paris, OECD (2004)
- 158) OECD guidelines for testing chemicals, 427, Paris, OECD (2004)
- 159) [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/docs/sccp\\_o\\_02j.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_02j.pdf)
- 160) Schäfer-Korting, M. et al., Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the German Prevalidation Study, ATLA, 34, 283, 2006
- 161) Netzlaff, F. et al., Comparison of Bovine Udder Skin with Human and Porcine Skin in Percutaneous Permeation Experiments, ATLA, 34, 499, 2006
- 162) Ngawhirunpat T. et al., Comparison of the percutaneous absorption of hydrophilic and lipophilic compounds in shed snake skin and human skin, Pharmazie, 61, 331, 2006
- 163) Ottaviani G. et al., Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability, J Med Chem, 29, 49, 3948, 2006
- 164) De Jager M. et al., A novel in vitro percutaneous penetration model: evaluation of barrier properties with p-aminobenzoic acid and two of its derivatives, Pharm Res, 23, 951, 2006
- 165) Chilcott R. P. et al., Inter- and intralaboratory variation of in vitro diffusion cell measurements: an international multicenter study using quasi-standardized methods and materials, J Pharm Sci, 94, 632, 2005
- 166) Katritzky A. R. et al., Skin permeation rate as a function of chemical structure, J Med Chem, 49, 3305, 2006
- 167) Diembeck W. et al., Skin absorption and penetration. ATLA, 33, Suppl.1, 105, 2005
- G. 研究発表
- G-1 論文発表
- 1) Hirota, M., Kitagaki, M., Itagaki, H., and Aiba, S., Quantitative measurement of spliced XBPI mRNA as an indicator of endoplasmic reticulum stress. J. Toxicol. Sci., 149-156, 2006.
- 2) Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., and Toyoda, H., Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. Toxicol In Vitro, 767-773, 2006.
- 3) Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota, M., Itagaki, H., Toyoda, H., and Suzuki, H., Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. Toxicol In Vitro, 774-784, 2006.
- G-2 学会発表 (講演及び学会発表)
- 1) 菌さき子, 足利太可雄, 萩野滋延, 板垣宏, "THP-1 細胞を用いた CD86 および CD54 発現を指標とした感作性試験代替法における蛍光標識抗体の検討", 第 16 回日本サイトメ

- トリー学会，2006.
- 2) 坂口齊，足利太可雄，小坂七重，宮澤正明，吉田雪子，伊藤勇一，菫さき子，石川牧恵，廣田衛彦，萩野滋延，板垣宏，鈴木尋之，“ヒト細胞株を用いた皮膚感作性試験代替法；human cell line activation test (h-CLAT) の開発”，第36回日本皮膚アレルギー学会（JSDA）総会 第31回日本接触皮膚炎学会（JSCD）総会合同学術大会，2006.
  - 3) 石川牧恵，足利太可雄，萩野滋延，板垣宏，“難水溶性物質の評価を目的としたTHP-1細胞の三次元培養ゲルモデルの開発”，第20回日本動物実験代替法学会，2006.
  - 4) 穂谷昌利，廣田衛彦，鈴木美絵，萩野滋延，板垣宏，“ヒト単球由来細胞株を用いた光感作性試験代替法の開発”，第20回日本動物実験代替法学会，2006.
  - 5) 鈴木美絵，廣田衛彦，萩野滋延，板垣宏，相場節也，“細胞表面-SH基を指標とした感作性試験代替法（SH-Test）の試験判断基準の構築化”，第20回日本動物実験代替法学会，2006.
  - 6) 廣田衛彦，鈴木美絵，萩野滋延，板垣宏，相場節也，“細胞表面-SH基を指標とした感作性試験代替法（SH-Test）の試験条件検討”，第20回日本動物実験代替法学会，2006.
  - 7) 廣田衛彦，鈴木美絵，加賀谷早織，佐々木喜教，水芦政人，萩野滋延，相場節也，板垣宏，“ハプテンによる細胞表面チオール基の減少—その生物学意義と応用（Ⅱ）：感作性試験代替法への応用を目的とした細胞腫の選択”，日本研究皮膚科学科学会第31回年次学術大会・総会，2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

該当なし

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
Hirota, M., Kitagaki, M., <u>Itagaki, H.</u> , and Aiba, S.	Quantitative measurement of spliced XBP1 mRNA as an indicator of endoplasmic reticulum stress.	J. Toxicol. Sci.		149-156	2006
Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., <u>Itagaki, H.</u> , Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., and Toyoda, H.	Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol.	Toxicol In Vitro,		767-773	2006
Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota, M., <u>Itagaki, H.</u> , Toyoda, H., and Suzuki, H.	Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT	Toxicol In Vitro		774-784	2006



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

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

ケトプロフェン(KP)は、外用テープ剤として広く使用されているが、副作用としてアレルギー性光接触皮膚炎を引き起こすことが知られている。既に我々はKPアレルギー性光接触皮膚炎マウスモデルを用いた検討でCD4陽性ヘルパーT(Th)細胞とCD8陽性細胞が重要な役割を担うことを示した。また、KP光惹起の過程において表皮細胞からTh1ケモカイン及びTh2ケモカインの発現が亢進し、T細胞上のそれぞれの受容体であるCXCR3及びCCR4の発現も亢進することも報告している。一般的に表皮の中でTh1ケモカインを放出するのはケラチノサイト、Th2ケモカインを放出するのはランゲルハンス細胞と考えられている。今回、我々はKP光接触皮膚炎発症時のTh細胞誘引におけるケラチノサイトの役割を調べるため、ヒト培養ケラチノサイトにKPとUVA処置を行い、Th1ケモカインであるMig及びIP-10の産生の変化を確認した。また、併せてTh2ケモカインであるMDC及びTARC、好中球の遊走に関与するRANTES、好酸球の遊走に関与するIL-8、ランゲルハンス細胞の機能亢進や生存に関与するIL-1 $\alpha$ 、GM-CSF及びTNF- $\alpha$ の産生についても確認した。さらにTh1ケモカイン産生の変化の生理学的意義を確認するため、KP+UVA処置したヒトケラチノサイト培養上清を用い、Th1細胞遊走の影響をケモタキシスアッセイで調べた。

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。

我々は、これまでの成果において光アレルギー

ギーを生じる光感作性物質で代表的なTCSA、bithionol、chlorpromazine、sparfloxacin、enoxacin において、アポトーシス誘導能があることを明らかにした。それと付随する形で、表皮ケラチノサイトからのサイトカイン、ケモカインを測定することで光アレルギー能を定量的に評価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サイトカイン、ケモカイン産生の解析

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、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広げた。そして、本研究の昨年までの成果として、HaCaT細胞と光アレルギー性を示す光感作性物質をUVA処理することでフローサイトメトリーによるアポトーシス、ネクローシスを解析したところ、アポトーシス誘導能があることを既に示した。これに付随する研究としてケラチノサイトからのサイトカイン、ケモカインの産生について検討を加えた。この方法についても、Broadband-UVB 照射装置と Narrowband-UVB 照射装置の 2 種類を使用してケラチノサイトに照射することでサイトカイン、ケモカインの産生に影響を与えることを示した(Hino R et al. Br J Dermatol, in press)。

### B-2) ケトプロフェン+UVA によるサイトカイン、ケモカイン産生の解析

ディッシュに 80 % semiconfluent に培養し、IFN- $\gamma$ で刺激した培養正常ヒトケラチノサイト(又は HaCaT)に  $10^{-8}$ ~ $10^{-6}$ M KP と  $1\text{J}/\text{cm}^2$  UVA を暴露し、48 又は 72 時間培養した。培養後、培地を回収し、培地中のケモカイン Mig, IP-10, TARC, MDC, RANTES, IL-8 とサイトカイン IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF を CBA 法又は ELISA 法で定量した。

### B-2) 細胞遊走能の評価

正常ヒトボランティアの末梢血より単核球を Ficoll-paque 法で採取し、Auto-MACS を用いて CD4 陽性 T リンパ球を分離した後、Th1 又は Th2 に分化誘導した細胞を用いてケモタキシスアッセイを行った。Transwell® を用い、B-2 で作製した培養上清により誘引された Th1, Th2 細胞数を測定し、% input を求めた。

#### (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 によるサイトカイン・ケモカイン産生への影響

Broadband-UVB 0, 10, 100 mJ/cm<sup>2</sup> 照射範囲内、および Narrowband-UVB 0, 100, 1000 mJ/cm<sup>2</sup> 照射範囲内において、紫外線照射によるTh1ケモカインMigの産生亢進、Th2ケモカインMDC、TARCのケラチノサイトからの産生低下が確認された。

C-2) 代表的な光アレルギー物質であるKPのサイトカイン、ケモカイン産生に対する影響Th1ケモカインにおいて、Mig放出の変化はなかったが、IP-10はKP処置によりUVA照射群及びUVA非照射群共にケラチノサイトからの放出量が減少した。UVA非照射群でも確認されたことからこの減少はKPの薬理作用による変化と考えられた。一方、Th2ケモカインはTh1ケモカインと比較してIFN- $\gamma$ 刺激による放出量がMDC及びTARC共に少なく、KP処置により放出量の変化も確認されなかった。ケラチノサイトはTh1ケモカインを放出するが、Th2ケモカインほとんど産生しないと考えられおり、今回のTh2ケモカインの結果はそれに一致した。また、RANTESはIP-10同様にKP処置によりUVA非依存的に減少し、IL-8はKP+UVA処置のみで減少した。さらにIL-1 $\alpha$ 、GM-CSF及びTNF- $\alpha$ は放出量の変化が確認されなかった。

C-3) Th1, Th2細胞のケモタキシスアッセイTh1細胞のケモタキシスアッセイにおいて、KP処置群は無処置と比較してUVA(+)及びUVA(-)共に%inputが減少した。また、併せてTh2細胞につ

いても確認したが顕著な遊走の変化はみられなかった。これらの結果はケモカイン放出量の結果に一致した。

#### 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 $\alpha$ 、TNF $\alpha$ 、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KC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様式もある。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、前回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、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。また、本年度の研究において、③KClに対するサイトカインの産生誘導を測定することで光アレルギー能を考察する上で包括的なアプローチが可能になると思われる。これまでの成果を生かすことで光アレルギー能のスクリーニング、および定量的評価が可能になると思われる。

#### E. 結論

光アレルギー物質であるケトプロフェンはTh1ケモカインIP-10の産生を低下させ、Th1細胞のケモタキシスを抑制した。また、RANTESも抑制した。UVA処置によってIL-8の産生も抑制した。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

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.

Kabashima K, Nagamachi M, Honda T, Nishigori C, Miyachi Y, Tokura Y, Narumiya S. Prostaglandin E(2) is required for ultraviolet B-induced skin inflammation via EP2 and EP4 receptors. *Lab Invest* 87:49-55, 2007.

Hino R, Kobayashi M, Mori T, Orimo H, Shimauchi T, Kabashima K, Tokura Y. Inhibition of T helper 2 chemokine production by narrowband ultraviolet B in cultured keratinocytes. *Br J Dermatol*. 2007 (in press).