

laboratory. There was some variation of CV75 among laboratories. This might have been caused by differences of culture conditions between laboratories, because the same lots of serum and the same cell line were used at all laboratories. However, the CV75s at the individual laboratory were very close to the common CV75s used in the second trial. The coefficient of variation for each test chemical was between 0.07 and 0.4, and the range of CV value was good compared with that in another inter-laboratory study on cytotoxicity assay (Tani et al., 1999). The results of the third trial are summarized in Table 4. Among the five test chemicals, p-benzoquinone, glutaraldehyde and lactic acid were correctly evaluated at all laboratories. On the other hand, two laboratories missed the sensitizing potential of ethylene diamine or eugenol. These results are almost the same as those in the second trial.

### Discussion

Several in vitro skin sensitization methods using cell lines have been reported in response to current trends in animal welfare and regulatory opinion (Casati et al., 2005), but final validation and regulatory acceptance have not yet been achieved. We have reported that h-CLAT using THP-1 cells was useful for predicting skin sensitization in vitro (Ashikaga et al., 2007; Sakaguchi et al., 2007). However, more data were needed, especially about the transferability of the protocol, and the inter-laboratory reproducibility of the test, in order to support formal validation activities (Hartung et al., 2004). Therefore, we organized a multi-laboratory study involving seven laboratories. As a first step, two well-known sensitizers (DNCB and Ni) and one non-sensitizer (SLS) were evaluated. The purpose of the first trial was to establish technology transfer of the h-CLAT protocol. Because all laboratories correctly evaluated the sensitization potentials of these three chemicals, transferability of the assay was judged to be basically good. However, some differences in dose-response relationship were observed. The reproducibility improved when re-evaluation was conducted with freshly cultured THP-1 cells. These results suggest that tight control of cell culture conditions is important, especially for good reproducibility of cell-based assay in which protein expression is used as an indicator.

Based on these results, we refined the standard operating procedure (SOP). We introduced the requirements that the viability of control cells should be more than 90 %, and that the viability in

the positive control should be more than 60%. After the introduction of tighter control of cell culture conditions, the reproducibility of the dose-response relationship was improved. From the result of the first trial, we concluded that the h-CLAT protocol is easy to transfer, and to further confirm the reproducibility with various kinds of chemicals, we tested four sensitizers and one non-sensitizer in a second trial. In the total of 35 tests (seven laboratories, five chemicals), there were two false-negatives (ethylene diamine and eugenol). Therefore, inter-laboratory reproducibility of the assay was basically good. Ethylene diamine is known to be very reactive with organic compounds (Agius et al., 1991), and it evaporates at room temperature. Further, eugenol showed poor water solubility at the application doses, because oil drops were observed in the cell culture medium. It would be difficult for h-CLAT to evaluate the sensitization potential of such chemicals, so the false negative results may simply reflect the particular characteristics of these two chemicals. It will be necessary to clarify the extent of applicability of h-CLAT, particularly in relation to the physico-chemical properties of target molecules. Some differences in CD86/CD54 expression pattern were also observed among laboratories. This confirms the importance of predicting sensitizing potential not just with one marker, but with two or more markers. Python et al. (2007) reported that a combination of at least two markers was needed to establish a reliable evaluation of dendritic cell activation potential. We also should mention problems of h-CLAT. Test chemicals are treated with THP-1 cells in cell culture medium. Therefore, if test chemical disperse non-equally in cell culture medium (e.g., sticky, water-proof particle, oil spill, etc.), h-CLAT may not evaluate these potential correctly. In addition, THP-1 is thought to almost not have metabolic enzymes such as P-450 (Prof. Yoshida, Showa Univ., personal communication). Therefore, h-CLAT might not be able to evaluate a potential of chemical that can be changed by metabolism. Study on the applicability domain of h-CLAT remains to be done.

Finally, chemicals tested in the second trial were re-evaluated with doses determined at each individual laboratory as a third trial, to see whether more appropriate application doses could be selected, depending on the precise test conditions. However, differences of the values of CV75 between laboratories were not large. Furthermore, the results (positive/negative judgment) were almost

the same as in the second trial with common application doses. In conclusion, further study is necessary, especially to clarify the limitations of the assay. Finally, all laboratories correctly judged the sensitization potential of six test chemicals among eight chemicals. These results suggest that the h-CLAT protocol is easy to transfer, and that inter-laboratory reproducibility is basically good. We consider that h-CLAT will be ready for formal pre-validation study after further minor improvements of the method.

#### Acknowledgements

This study was supported by a Grant-in-aid from MHLW.

#### References

- Agius, R. M., Nee, J., McGovern, B., Robertson, A., (1991) Structure activity hypotheses in occupational asthma caused by low molecular weight substances, *Ann. Occup. Hyg.*, 35(2), 129-37.
- Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., and Tagami, H., (1997) Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules, *European Journal of Immunology*, 27, 3031-3038.
- Ashikaga, T., Hoya, M., Itagaki, H., Katamura, Y., and Aiba, S., (2002) Evaluation of CD86 expression and MHC class II molecule internalization in THP-1 human monocyte cells as predictive endpoints for contact sensitizers, *Toxicology in Vitro*, 16, 711-716.
- Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., and Toyoda, H., (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, 767-773.
- Ashikaga, T., Kosaka, N., Sono, S., Sakaguchi, H., Suzuki H., and Itagaki H., (2007) Comparative evaluation of the in vitro skin sensitization test, human Cell Line Activation Test (h-CLAT) with LLNA and human data, *The Toxicologist*, 96 (1), 237.
- Becker, D., Kolde, G., Reske, K. and Knop, J., (1994) An in vitro endocytotic activation of murine epidermal langerhans cells under the influence of contact allergens, *Journal of Immunological Methods*, 169, 195-204.
- Casati, S., Aeby, P., Basketter, D. A., Cavani, A., Gennari, A., Gerberick, G. F., Griem, P., Hartung, T., Kimber, I., Lepoittevin, J. P., Meade, B.J., Pallardy, M., Rougier, N., Rousset F., Rubinstenn, G., Sallusto, F., Verheyen, G. R., and Zuang, V., (2005) Dendritic cells as a tool for the predictive identification of skin sensitisation hazard.; The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 51, *Altern. Lab. Anim.*, 33(1), 47-62.
- De Silva, O., Basketter, D. A., and Barrat M. D., (1996) Alternative methods for skin sensitization testing, *Alternative Laboratory Animals*, 24, 683-705.
- Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kern, P. S., Schlatter. H., Dearman, R. J., Kimber. I., Patlewicz, G. Y., and Basketter, D. A., (2005) Compilation of historical local lymph node data for evaluation of skin sensitization alternative methods, *Dermatitis*, 16(4), 157-202.
- Hartung, T., Bremer, S., Casati, S., Coecke, S., Corvi, R., Fortaner, S., Gribaldo, L., Halder, M., Hoffmann, S., Roi, A. J., Prieto, P., Sabbioni, E., Scott, L., Worth, A., and Zuang, V., (2004) A modular approach to the ECVAM principles on test validity, *Altern. Lab Anim.*, 32(5), 467-72.
- Hopper, U., Degwerat, J., and Steckel, F., (1995) Use of CD1a- dendritic cells and keratinocytes to characterize cellular reaction involved in allergic contact dermatitis, *Journal of Cellular Biochemistry*, 21, Supple A, 11-18.
- Python, F., Goebel, C., Aeby, P., (2007) Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 220, 113-24.
- Tani, N., (1999) Interlaboratory Validation of the In Vitro Eye Irritation Tests for cosmetic Ingredients. (8) Evaluation of Cytotoxicity Tests on SIRC cells, *Toxicology in Vitro*, 13, 175-187.
- Rougier, N., Redziniak, G., Mougin, D., Schmitt, D., and Vincent, C., (2000). In vitro evaluation of the sensitization potential of weak contact allergens using Langerhans-like dendritic cells and autologous T cells, *Toxicology*, 145, 73-82.
- Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota, M., Itagaki, H., Toyoda, H., and Suzuki, H., (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.

Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., and Suzuki, H., (2007) Prediction of preservative sensitization potential using surface marker CD86 and/or CD54 expression on human cell line, THP-1, *Arch. Dermatol. Res.*,\*298, 427-37.

Yoshida, Y., Sakaguchi, H., Ito, Y., Okuda, M., and Suzuki, H., (2003) Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naïve THP-1 cell line, *Toxicology in Vitro*, 17, 221-228.

(Received: August 6, 2007/  
Accepted: December 29, 2007)

**Corresponding author:**

Takao Ashikaga  
Shiseido Co., Ltd., Quality Assurance Center,  
2-12-1, Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama,  
236-8643, Japan  
Tel: +81-45-788-7308  
Fax: + +81-45-788-7295  
E-mail: takao.ashikaga@to.shiseido.co.jp

## 細胞表面-SH基を指標とした感作性試験代替法(SH test)

廣田 衛彦\*<sup>1</sup> 鈴木 美絵\*<sup>2</sup> 板垣 宏\*<sup>3</sup> 相場 節也\*<sup>4</sup>

**Abstract** : Evaluation of the skin sensitization potential of ingredients is an important part of the development of cosmetics and toiletries, and the mechanism of skin sensitization is very interesting field of immunology. We focused activation of antigen-presenting cells (APCs) in order to develop *in vitro* sensitization test. It is known that the activation of APCs including Langerhans cells (LCs) and dendritic cells (DCs) is accompanied by the augmentation of CD86 expression, following phosphorylation of p38 as upstream signals. In this study, we hypothesized that redox imbalance might be one of the triggers of p38 MAPK signal in hapten-treated APCs. So, we confirmed that haptens induced redox imbalance in monocyte-derived DCs and THP-1 cells, human monocytic cell line. For development of short-term and easy assay, we focused cell surface thiols, which were thought to reflect intracellular redox imbalance and evaluated. As a result, cell surface thiols on THP-1 were changed by the treatment of haptens. These data indicated that cell surface thiols might be a useful biomarker for an *in vitro* sensitization test.

**Key words** : dendritic cells, THP-1, *in vitro* sensitization test, redox imbalance, cell surface thiols, SH test

## 1. はじめに

弊社を含む化粧品メーカーにとって、開発した製品をお客さまに安心して、そして安全に使用していただくことは、何より大切なことである。このため、化粧品に使用される原料の安全性保証に

は多くの厳しい試験が必要である。化粧品の多くはお客さまの肌に直接使用される物であるため、皮膚に対する安全性試験は非常に重要であるが、その中で皮膚アレルギー試験は重要なものであると同時に、そのメカニズムは免疫学の研究対象としても興味深いものである。一方、2003年3月

“Development of *in vitro* sensitization test using changes of cell surface thiols as a biomarker (SH test).”



\*<sup>1</sup>Morihiko Hirota (Safety Research labs., Shiseido Quality Assurance Center, 株式会社資生堂品質保証センター安全性研究所—236-8643 神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-1)

\*<sup>2</sup>Mie Suzuki, \*<sup>3</sup>Hiroshi Itagaki (In vitro Toxicology Research Labs., Shiseido Quality Assurance Center, 株式会社資生堂品質保証センター代替法開発研究所—236-8643 神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-1)

\*<sup>4</sup>Setsuya Aiba (Department of Dermatology, Tohoku University of Medicine, 東北大学大学院医学系研究科皮膚科学講座—980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町1-1)

\*<sup>1</sup>(写真左上) 東北大学大学院農学研究科修了, 1999年(株)資生堂入社, 現在同社品質保証センター安全性研究所研究員

\*<sup>2</sup>(写真右上) 京都大学大学院生命科学系研究科修了, 2004年(株)資生堂入社, 現在同社品質保証センター代替法開発研究所研究員

\*<sup>3</sup>(写真左下) 東北大学薬学部卒業, 同大学薬学研究科博士課程修了, 1983年(株)資生堂入社, 現在同社品質保証センター代替法開発研究所所長, 薬学博士。2007年より日本動物実験代替法学会会長

\*<sup>4</sup>(写真右下) 東北大学医学部卒業, 同大学医学研究科博士課程修了, 現在, 東北大学大学院医学系研究科皮膚科学講座教授



に公布された「EU化粧品指令第7次改正」に伴い、2009年3月までにEU域内での化粧品における動物実験が禁止される見通しである。このため、皮膚アレルギー試験を始めとする安全性試験の代替法開発は、製品を開発する企業側にとっても、製品の安全性を監視する立場である行政側にとっても重要な課題である。

代替法開発の第一ステップは、毒性メカニズムを理解することである。皮膚アレルギーの発症は2つのステージ（感作誘導期と感作誘発期）から成り立っていると考えられている。感作誘導期はアレルギーが成立する過程を指し、皮膚においては、皮膚中に存在する抗原提示細胞である、ランゲルハンス細胞が感作誘導の成立に重要な役割を果たすことが知られている。この背景の中で、共同筆者である相場らは、末梢血由来単球から培養した樹状細胞に感作性物質を添加すると、ランゲルハンス細胞と同様にCD86などの分子が発現亢進することを見いだした<sup>1)</sup>。このことは、培養系においても、感作性物質処理により樹状細胞が活性化することを示唆している。しかし、樹状細胞は末梢血から調製されるため、個人差や血液の安定供給などに関する問題があり、日常試験に用いることは難しい。一方、弊社の足利らは、末梢血由来樹状細胞の代わりに、単球系培養細胞であるTHP-1を使用し、CD86発現を測定することで、感作性物質を評価できる可能性を見だし<sup>2)</sup>、花王株式会社との共同研究を実施している<sup>3)</sup>。しかし、①*in vivo*試験を単一の方法で外挿することは、非常に難しいと推測されたこと、②感作性物質による樹状細胞およびTHP-1細胞の活性化のメカニズムにおいて、まだ未解明の部分があり、学術的に非常に興味深いことから、弊社および東北大学は、産学協同で、樹状細胞およびTHP-1細胞の感作性物質による活性化メカニズムに関する検討を行った。今回、その結果の一部と検討結果を活用した、新たな感作性試験代替法（SH test）の開発について紹介する。

## 2. 感作性処理された樹状細胞およびTHP-1の細胞内シグナル活性化

SH testに関する検討を行う以前の段階で、感

作性物質による樹状細胞活性化における細胞内シグナル伝達活性化に関する研究がいくつか報告されていた。例えば、本報告の共同著者である相場らのグループは、感作性物質処理した樹状細胞のCD86発現亢進に細胞内シグナル伝達の一つであるp38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) のリン酸化が関与していることを見いだしている<sup>4)</sup>。さらにBoislevreらのグループは、樹状細胞のリンパ節への遊走に重要な役割を果たすCCR7においても、p38 MAPKが関与することを報告している<sup>5)</sup>。しかし、感作性物質による樹状細胞活性化における、p38 MAPKの上流シグナルについては、明らかになっていなかった。そこで我々はp38 MAPKの上流シグナルの一つである、細胞内酸化状態に着目して検討を行った。その結果、図1に示すように、Sub-lethal濃度における感作性物質(2,4-ジニトロクロロベンゼン(DNCB)、塩化ニッケル(NiCl<sub>2</sub>)、塩化マンガン(MnCl<sub>2</sub>)、ホルムアルデヒド(HCHO)、Thimerosal)処理により、末梢血由来樹状細胞の細胞内Redox状態の指標であるGSH/GSSG比(細胞内還元型グルタチオン(GSH)濃度と酸化型グルタチオン(GSSG)濃度の比)が低下し、細胞内が酸化状態になることが明らかとなった。また、感作性物質による細胞内GSH/GSSG比の低下は、前述の細胞株THP-1でも同様に観察された<sup>6)</sup>。THP-1細胞は感作性物質処理により樹状細胞と同じくCD86発現を亢進することが知られていることから、THP-1細胞における活性化における上流シグナルについても、細胞内Redox変化が関与していることが示唆された。さらに、感作性物質(DNCB、*p*-フェニレンジアミン(*p*PD)、硫酸ニッケル(Ni))処理したTHP-1細胞のマイクロアレイ解析においても、細胞内Redox状態に関与する遺伝子群(グルタチオン合成酵素類、ヘムオキシゲナーゼなど)の変化が検出された(図2)<sup>7)</sup>。これらの結果から、感作性物質による樹状細胞およびTHP-1細胞の活性化において、細胞内Redox変化は重要な役割を果たすと考えられた。

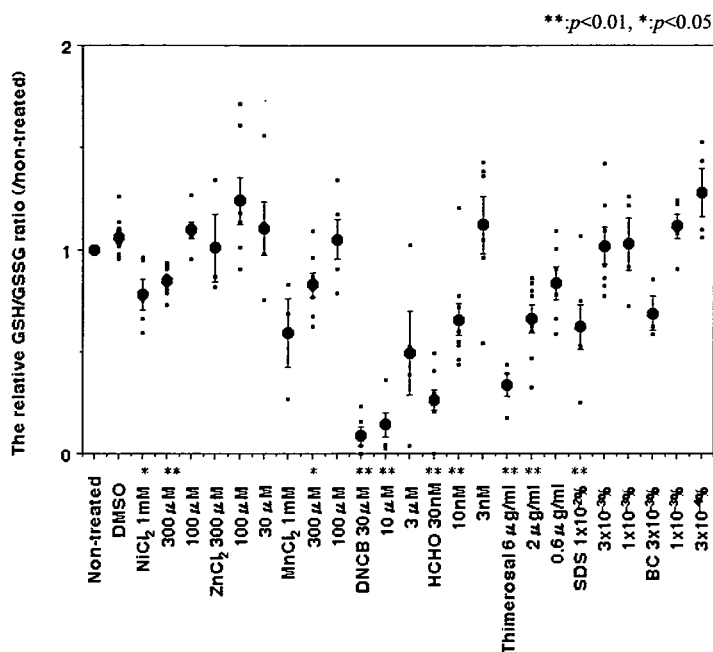


図1 感作性物質、非感作性物質処理した末梢血由来樹状細胞における細胞内GSH/GSSG比の変化<sup>6)</sup>

図2 感作性物質処理したTHP-1のマイクロアレイ解析における細胞内Redox関連遺伝子の発現(文献7(改編))

Accession no.	Gene Name	Symbol	Expression ratio		
			DNCB	pPD	Ni
X06985	Heme oxygenase 1	HMOX1	2.2	12.9	68.9
BC041809	Gamma glutamylcysteine synthetase regulatory subunit	GCLM	0.8	5.9	39.3
X51757	Heat shock 70kD protein 6	HSPA6	6.7	1.7	35.0
BC012423	Superoxide dismutase 2	SOD2	2.4	1.4	34.0
AY217548	V-jun homolog	JUN	5.4	1.7	19.2
NM_002032	Ferritin heavy polypeptide 1	FTH1	5.9	2.4	12.8
J03934	DT diaphorase	NQO1	2.5	3.7	8.9
AK092744	Ferritin light polypeptide	FTL	2.5	2.6	5.9

### 3. 細胞内酸化状態から細胞膜酸化状態への着目

Filomeniらのグループは、ヒト株化細胞であるU-937に細胞膜非透過型の酸化剤の一つである酸化型グルタチオン処理すると、細胞表面-SH基の減少、細胞内Redox状態の変化、ASK-1およびp38 MAPKの活性化、アポトーシス誘導が起こることを報告している<sup>8)</sup>。酸化型グルタチオンは細胞膜を透過しないことから、Filomeniらのグループは細胞表面-SH基の減少が細胞内シグナル活性化に関与していると考察している。すべての感

作性物質が細胞表面-SH基のみに作用するとは考えにくい。細胞表面-SH基は、感作性物質と細胞の最初の接点である、細胞膜中のタンパク質に存在することとFilomeniらの報告<sup>8)</sup>を合わせて考えると、細胞表面-SH基の変化が図3のように、細胞内p38 MAPKの上流シグナルの一つとして、樹状細胞やTHP-1細胞の活性化に関与している可能性があると考え、細胞表面-SH基が感作性試験代替法の指標となるか否か検討した。

代表的な感作性物質であるDNCBをTHP-1細胞に処理し、2時間後における細胞表面-SH基をフローサイトメトリーで測定したところ、濃度依存

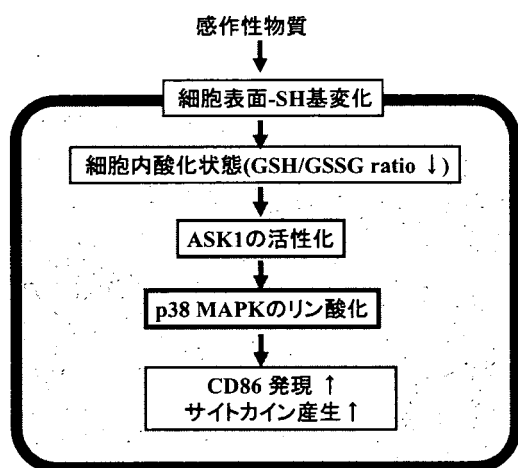


図3 感作性物質による細胞表面-SH基変化

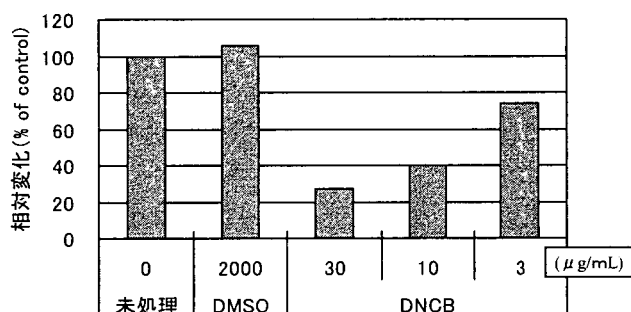


図4 DNCBに処理による細胞表面-SH基変化

的な細胞表面-SH基の減少が観察された(図4)。

#### 4. 細胞表面-SH基測定 (SH test) に関するプロトコルの最適化

細胞表面-SH基を測定するためには、細胞膜非透過性のチオール基反応試薬で細胞を標識してから測定されるが、文献で報告されている例としては、DTNB(5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid))を用いて比色定量する方法や蛍光標識されたマレイミド試薬を用いてフローサイトメトリー解析などが報告されている<sup>9), 10)</sup>。我々は、Filomeniらのグループが使用していたAlexa Fluor C5 maleimide (以下, AFM) を用いて実験を行った。細胞表面-SH基が感作性試験の指標になるかどうかを評価するためには、再現性が確保でき、感度の良い測定プロトコルを構築する必要がある。このために、我々は、①被験物質の処理時間、②処理時間細胞をAFMで染色する条件に関する検討を行い、SH testの測定プロトコルを作成した。

#### 4-1. 被験物質の処理時間に関する検討

最初に、細胞表面-SH基解析における被験物質の処理時間について検討した。結果、DNCB処理後、15分の時点ですでに細胞表面-SH基がある程度減少しており、その後も緩やかな減少を示した。図5の結果から、被験物質の処理時間は、細胞表面-SH基の減少を感度良く検出できる120分が最適と考え、以後の細胞表面-SH基の測定は、被験物質120分処理で行うこととした。

#### 4-2. 処理時間細胞をAFMで染色する条件検討

通常、細胞を抗体で染色するときは、抗体をBSA (bovine serum albumin) や血清などを添加したPBSで希釈し、染色液とすることが多い。しかし、AFMはチオール基に結合する試薬のため、染色液中に含有されるタンパク質が染色に影響を与える可能性が考えられた。そこで、AFM染色におけるタンパク質の影響を調べた。AFMの染色液としてPBS, PBSにBSAを0.1%添加したFACS bufferおよび、10%血清を添加したRPMI1640培地(以下、血清入り培地)を用いた場合の測定値を比較した。その結果、AFM染色液にFACS bufferおよび血清入り培地を使用すると、細胞をフローサイトメトリー測定に供した際の平均蛍光強度(MFI)がPBSを使用した場合と比較して低値を示した(図6)。この結果から、通常の抗体染色で使用する、BSAやタンパク質の染色液への添加は、細胞表面チオール基染色においては不相当と考えた。

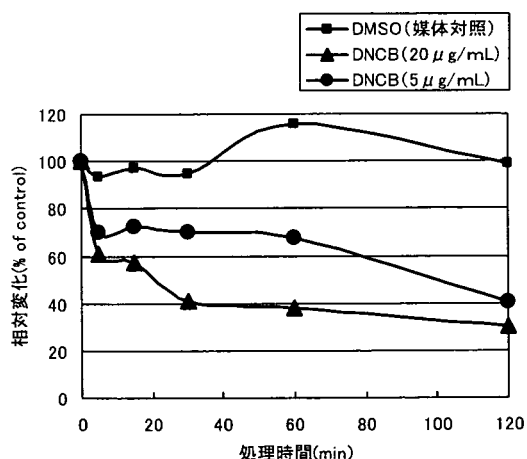


図5 DNCBに処理による細胞表面-SH基変化 (タイムコース)

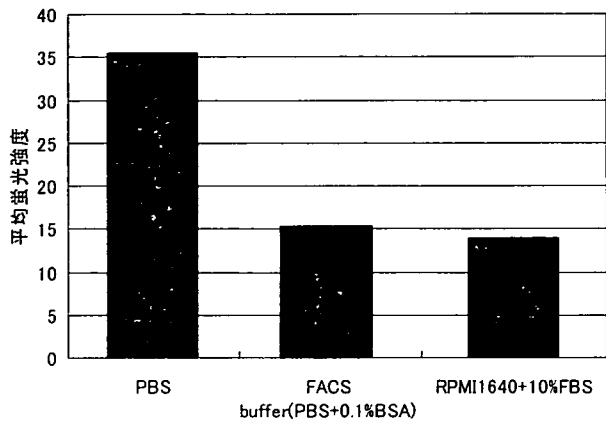


図6 AFM染色におけるBSA及び血清の影響

#### 4-3. 測定プロトコルの作成

これまで検討した結果を踏まえ、以下に示すような試験プロトコルを作成した。

- ① 2時間処理における細胞毒性試験によるIC<sub>50</sub>値を基準とした濃度設定 (IC<sub>50</sub>, 1/3 × IC<sub>50</sub> 値, 1/9 × IC<sub>50</sub> 値)
- ② THP-1細胞 (1 × 10<sup>6</sup>/mL/well) を24穴培養プレートに播種
- ③ 被験物質処理
- ④ 2時間培養
- ⑤ 細胞をPBSで洗浄
- ⑥ AFM染色液 (BSAなどのタンパク質は添加しない) にて、30分染色
- ⑦ 細胞をPBSで洗浄
- ⑧ フローサイトメトリー解析

#### 5. 被験物質を用いたSH testの評価検討

代表的な感作性物質および非感作性物質10品について、2時間処理における細胞毒性試験を実施後、SH testによる評価を実施した。物質名と2時間処理におけるIC<sub>50</sub>値は以下に示した。

##### ●感作性物質

- ▶ DNCB (2,4-Dinitrochlorobenzene, IC<sub>50</sub> 値; 150 μg/mL)
- ▶ DPCP (Diphenylcyclopropanone, IC<sub>50</sub> 値; 70 μg/mL)
- ▶ pPD (*p*-Phenylenediamine, IC<sub>50</sub> 値; > 5000 μg/mL)
- ▶ CoSO<sub>4</sub> (Cobalt sulfate heptahydrate, IC<sub>50</sub> 値; 2000 μg/mL)
- ▶ CA (Cinnamic aldehyde, IC<sub>50</sub> 値; 470 μg/mL)
- ▶ NiSO<sub>4</sub> (Nickel sulfate hexahydrate, IC<sub>50</sub> 値; > 5000 μg/mL)
- ▶ 2-MBT (2-Mercaptobenzothiazole, IC<sub>50</sub> 値; > 1000 μg/mL)

##### ●非感作性物質

- ▶ LA (Lactic acid, IC<sub>50</sub> 値; 3300 μg/mL)
- ▶ SLS (Sodium lauryl sulfate, IC<sub>50</sub> 値; 50 μg/mL)
- ▶ Tween 80 (IC<sub>50</sub> 値; > 5000 μg/mL)

なお、細胞毒性試験の処理可能最高濃度は、水溶

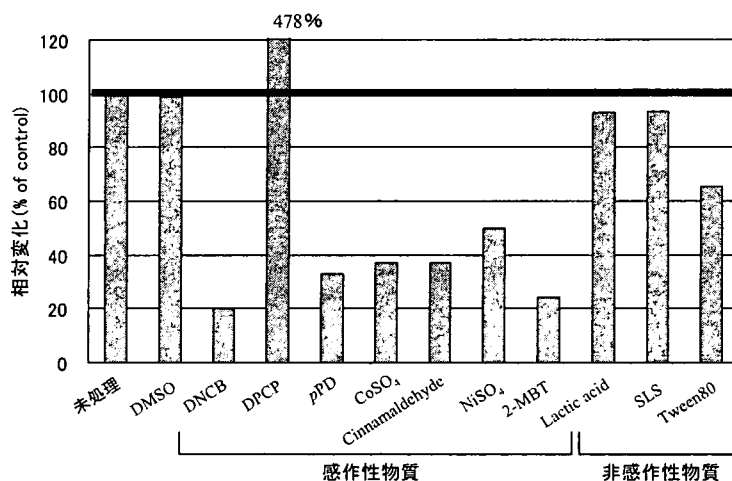


図7 被験物質による細胞表面-SH基変化



性物質で5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、非水溶性物質で1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

図6に示したグラフは、設定した3濃度中、媒体対照と比較して最も大きな変化を示した値を示した。図6に示すように、感作性物質7品中、6品において細胞表面-SH基の減少が確認された。また、非感作性物質においては、Tween80において、減少が確認された。興味深いことに、感作性物質であるDPCPにおいては、細胞表面-SH基の増加が確認された。感作性物質においては、細胞表面-SH基の細胞表面-SH基の減少または増加が確認され、SH testは感作性を検出する指標として有用な可能性が示唆された。

## 6. おわりに

前述のように弊社では、感作性試験代替法として、THP-1細胞のCD86、CD54発現を指標とした試験法(h-CLAT)を開発している。今回、CD86などの上流シグナルを検出する方法として、SH testの検討結果について述べてきた。安全性を評価する試験法は、信頼性および正確性が大切であることは、言うまでもない。しかし一方で、試験法である以上、コスト、試験の操作性、試験期間など要因も無視できない。さらに大切なことは、開発した試験法によってお客様の安全性が保証できる、ということである。今回の結果より、SH testは、偽陽性を検出する可能性が示唆されたものの、偽陰性が少ない試験法である可能性が示唆された。また、処理時間が2時間であること、市販の抗体を使用しないこと、試験にかかる費用が安いことから、スクリーニング系としても使用できる可能性も示唆された。これらの結果から、SH testは偽陰性が少ないという感度の面とコスト・測定時間といった便利さを両立した試験法であると期待された。

最後に、動物実験代替法開発は、前に述べたEU化粧品指令のような法令への対応、動物愛護の観点にとどまらず、製品開発期間の短縮化、コスト削減の関連からも興味深い研究課題である。現時点でSH testを感作性試験代替法として実用化するためには、様々な課題がある。しかし、樹状細胞やTHP-1細胞における活性化メカニズムのより深い理解、およびSH testによる、さらに多くの被験物質による評価など、研究として興味深い点がいくつかあることから、今後の展開を期待したい。また、近い将来、産学問わず国内外の多くの方々の力により、感作性試験代替法にとどまらず、他の毒性試験に対応した動物実験代替法が開発されること、さらに実際の試験として実用化されていくことを期待する。そして、我々も微力ながら貢献できれば幸いである。

## 参 考 資 料

- 1) Aiba, S. et al., *Eur. J. Immunol.*, **27**, 3031~3038 (1997)
- 2) Ashikaga T. et al., *Toxicol. In Vitro*, **16**, 711~716 (2002).
- 3) 足利太可雄, 坂口 斉, *Fragrance Journal*, **32** (8), 108~111 (2004)
- 4) Aiba S. et al., *J. Inves. Dermatol.*, **120**, 390~399 (2003)
- 5) Boislevy F et al., *J Invest Dermatol.*, **123**, 494~502 (2004)
- 6) Mizuashi M. et al., *J. Inves. Dermatol.*, **124**, 579~586 (2004)
- 7) Hirota M., Moro O., *Toxicol. In Vitro*, **20**, 736~742 (2006)
- 8) Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo M.R., *FASEB J.*, **17**, 64~66 (2003)
- 9) Laragione T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 14737~14741 (2003)
- 10) Sahaf B. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 4001~4005 (2003)

## Validation studies on an alternative endpoint for the local lymph node assay (LLNA-DA): Importance of study management

Takashi Omori<sup>1</sup>, Yoshiaki Ikarashi<sup>2</sup>, Yukiko Kanazawa<sup>3</sup>, Kenji Idehara<sup>4</sup>, Hajime Kojima<sup>2</sup>, Takashi Sozu<sup>5</sup>,  
Kazunori Arima<sup>6</sup>, Hirohiko Goto<sup>7</sup>, Tomohiko Hanada<sup>8</sup>, Taketo Inoda<sup>9</sup>, Tadashi Kosaka<sup>10</sup>, Eiji Maki<sup>11</sup>,  
Takashi Morimoto<sup>12</sup>, Shinsuke Shinoda<sup>13</sup>, Naoki Shinoda<sup>14</sup>, Masahiro Takeyoshi<sup>15</sup>, Masashi Tanaka<sup>16</sup>,  
Mamoru Uratani<sup>17</sup>, Masahito Usami<sup>18</sup>, Atsushi Yamanaka<sup>19</sup>, Tomofumi Yoneda<sup>20</sup>,  
Isao Yoshimura<sup>21</sup> and Atsuko Yuasa<sup>22</sup>

<sup>1</sup>Kyoto University SPH, <sup>2</sup>National Institute of Health Sciences, <sup>3</sup>Food and Drug Safety Center, <sup>4</sup>Daicel Chemical Industries Ltd.,

<sup>5</sup>Osaka University, <sup>6</sup>Taisho Pharmaceutical Co. Ltd., <sup>7</sup>Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd., <sup>8</sup>Nippon Shinyaku Co. Ltd.,

<sup>9</sup>Nakano Seiyaku Co. Ltd., <sup>10</sup>Institute of Environmental Toxicology, <sup>11</sup>Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides,

<sup>12</sup>Sumitomo Chemical Co. Ltd., <sup>13</sup>Drug Safety Testing Center Co. Ltd., <sup>14</sup>Santen Pharmaceutical Co. Ltd.,

<sup>15</sup>Chemicals Evaluation and Research Institute, <sup>16</sup>Meiji Seika Kaisha Ltd., <sup>17</sup>Ishihara Sangyo Kaisha Ltd., <sup>18</sup>Hoyu Co. Ltd.,

<sup>19</sup>Pias Corporation, <sup>20</sup>Toaeiyo Ltd., <sup>21</sup>Tokyo University of Science and <sup>22</sup>Fuji Film Co. Ltd.

Corresponding author: Takashi Omori

Department of Biostatistics, Kyoto University School of Public Health

Yoshida Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

Phone: +(81)-75-753-4482, Fax: +(81)-75-753-4487, omori@pbh.med.kyoto-u.ac.jp

### Abstract

We conducted 2 validation studies for a modified version of the local lymph node assay (LLNA), which was designated as the LLNA-DA. A total of 17 laboratories tested the validity of the assay by using 14 chemicals. Here, in addition to the experimental protocol, we prepared the study protocols describing the study purpose, the role of the participants, etc. Technology transfer was conducted by the developer of the assay. Prior to the studies, preliminary tests using only a positive control chemical were conducted to determine whether the experimental protocol prescribed for the assay was appropriate. A formatted data file was developed for data management. Fortunately, the results of these studies revealed small interlaboratory variations, and we believe that one of the factors that contributed to the successful results was the development of strategies and tools for study management at the planning stage itself. However, issues related to the management of validation studies have rarely been discussed. Strategies or tools developed for study management should be easily accessible and should be shared with researchers intending to conduct validation studies in the future.

**Keywords:** interlaboratory validation study, study management, protocol, technical transfer, data quality

### Introduction

An interlaboratory validation study examines the reliability and relevance of a particular test method (Organization of Economic Co-operation and Development (OECD), 2005). It differs from a single laboratory study in that it involves many persons having different backgrounds and levels of experience. To minimize interlaboratory variations, it is necessary that all the participating researchers from each laboratory understand how to operate the test method and perform it accurately, according to the procedure specified for the study rather than the customary procedure used in their respective laboratories. Therefore, appropriate management is

one of the challenges encountered in the success of an interlaboratory validation study.

The murine local lymph node assay (LLNA) has developed as an alternative to the guinea pig test for assessing skin sensitization. In this method, lymphocyte proliferation in the draining auricular lymph nodes is measured by the incorporation of radioactive molecules (OECD, 2002). Recently, several nonradioactive methods have been proposed. Daicel Chemical Industries Ltd. has developed a modified nonradioactive version of the LLNA that is based on the ATP content (Yamashita, 2005). Since this method was originated by Daicel Chemical Industries Ltd. and is based on the ATP content,

it is designated as the LLNA-DA. To evaluate the LLNA-DA, 2 validation studies were conducted by 23 researchers from 22 organizations. The first study examined the reliability and relevance of the method using 12 chemicals in 10 experimental laboratories. The second study examined the reliability of the method using 5 chemicals in 7 experimental laboratories.

Since these validation studies were conducted on a large scale, appropriate management was essential. Therefore, strategies and tools were developed for their management. Fortunately, the results of these studies on the LLNA-DA successfully revealed small interlaboratory variations and good relevance. We believe that one of the factors that contributed to the good results was the strategies and tools employed for managing the study. However, issues related to the management of validation studies have rarely been reported.

In this article, we report the strategies and tools that we developed for managing the LLNA-DA validation studies. First, we describe the 2 protocols used. Next, we discuss the seminar for technology transfer and the preliminary tests that were conducted. Further, we introduce the web folder that was developed for use, and we subsequently describe the formatted data file. Finally, we discuss the management of the validation studies and present our conclusion.

### Two types of protocols

In commonly used dictionaries, the word "protocol" is defined as the plan for a medical treatment course or for a scientific experiment or as a predefined written procedure for designing and implementing experiments. In the context of clinical studies, its meaning is more specific. The word protocol describes a method to be used in a clinical trial or a medical research study. With regard to the purpose of a protocol in clinical studies, Collins (2001) states that "It describes in a clear and detailed manner how the trial is performed so that all investigators know the procedures. This is particularly important in multicenter trials where it can be difficult to ensure that all centers and investigators conduct the study properly." The difficulty encountered in multicenter trials that he states here is identical to that encountered in an interlaboratory validation study. Therefore, this type of a protocol that describes the method to be followed for performing various steps in a validation study should be required. On the other hand, the OECD guidance document 34 (OECD, 2005) defines a protocol as "the detailed, unambiguous step-by-step description of a test method that directs the laboratory as to how to perform the test method." In this case, the protocol pertains to the implementation of a test method but not to a validation study for the test method. Most biologists appear to be familiar

with this definition, and without doubt, this type of protocol is also required in a validation study.

Therefore, 2 types of protocols were prepared for the validation study of the LLNA-DA. We designated the first document as the study protocol and the second one, as the experimental protocol. Fig. 1 shows the table of contents of the study protocol used for our study.

1. Introduction
2. Purpose of the study
3. Role of the researchers
4. Standard operating procedure for LLNA-DA
5. Time schedule
6. Participant organization
7. Chemicals tested
8. Chemical allocation
9. Preparation of animals, equipment, and materials
10. Expenditure
11. Technology transfer and preliminary test
12. Data management
13. Data analysis
14. Meeting held to discuss the results
15. Announcement of the results
16. Inquiries

Fig. 1. Table of contents of the protocol employed for the first study on the LLNA-DA.

### Seminar for technology transfer and preliminary tests

Even if a well-documented experimental protocol is prepared, toxicologists from different laboratories may interpret the document differently. In order to determine their understanding of the experimental protocol and to explain the execution of the test method, a 1-day seminar for technology transfer was held by the LLNA-DA developer prior to each study. It was required to be attended by at least 1 toxicologist from each experimental laboratory.

To confirm that the experimental protocol was being adequately documented, a preliminary test employing only a positive control chemical, namely, hexylcinnamic aldehyde, was conducted prior to each study.

Fig. 2 (a) and (b) shows the results of the preliminary tests performed for each study. The plot illustrates the stimulation index (SI) value, which is the endpoint of interest in the LLNA-DA and is defined as an increase in the ATP content in the chemical-treated group relative to the vehicle control group, along with its 95% confidence intervals for all the laboratories. Only one experimental dose was used in the preliminary test for the first study; however, in order to assess the dose-response relationships, 2 different doses were used in the preliminary test for the second study. Based on these plots and the historical data obtained from Daicel

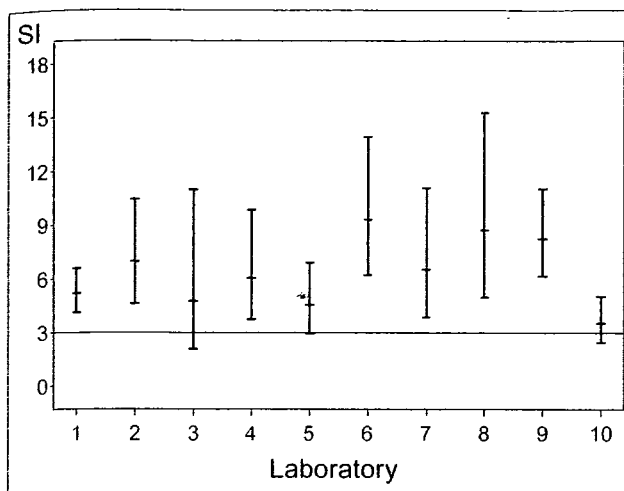


Fig. 2. (a) SI value with 95% confidence intervals obtained for the positive control chemical (25% hexylcinnamic aldehyde) in the preliminary test performed during the first study.

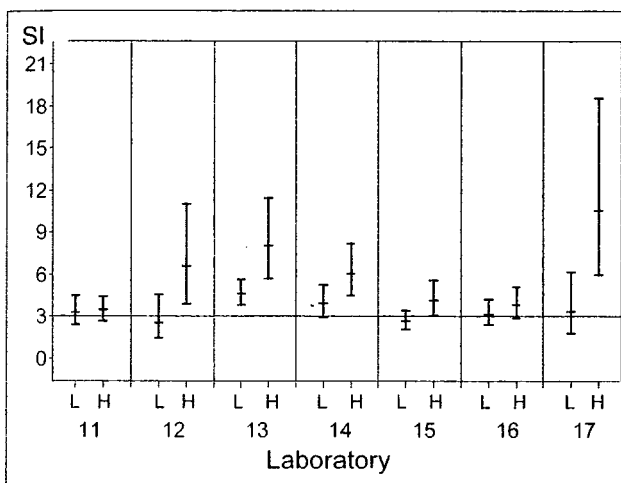


Fig. 2. (b) SI value with 95% confidence intervals obtained for the positive control chemical (10% (L) and 25% (H) hexylcinnamic aldehyde) in the preliminary test performed during the second study.

Chemical Industries Ltd., we discussed whether revisions were needed in the experimental protocol.

#### Use of a folder on a website

During a project, many documents related to a validation study are repeatedly revised to ensure that they reflect the opinions of each researcher. One of the problems is that often important documents are lost or may fail to be updated. Therefore, all the researchers involved in the study are required to be well versed with the latest version of the documents.

To enable easy access to the latest version of the necessary documents pertaining to the validation studies, we used a commercial web tool, i.e., a folder on the website. By using this tool, all researchers could download the document via the internet onto any personal computer at their respective workplaces as and when required. Once a document was uploaded

onto the web folder, it could be downloaded at any time. The web folder was set such that only the study manager was able to update the documents. When the study manager decided to upload or update a document, he accessed the web folder and uploaded the latest version of the document and then deleted the older version from the folder. Subsequently the study manager would then inform all the researchers that the document had been updated. This rule was strictly followed throughout the study.

#### Formatted data file

To directly collect the raw data obtained from the experimental laboratories and to construct a database, an MS-Excel formatted file was prepared for entering the experimental data. One of the advantages of MS-EXCEL is that it is widely available, and many researchers can use it at their respective workplaces. Another advantage is that it has several useful functions. For example, it is possible to protect the data from being entered into an unintentional cell on the formatted file.

The empty formatted data file along with a document describing how it was to be used was distributed to the experimental laboratories prior to commencement of the experiment. Following data entry into the formatted data file, the file and the record that was maintained for the values observed during the experiment were collected from all the experimental laboratories. A biostatistician examined the values in both the file and the record. When needed, the toxicologist who carried out the LLNA-DA in the experimental laboratory was inquired about it. After resolving this issue, the biostatistician constructed a database on which all the data analysis was carried out. The purpose of constructing such a database is to ensure that the quality of the data is maintained.

#### Discussion

The OECD guidance document 34 (OECD, 2002) and the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) guidelines for the nomination and submission of new, revised, and alternative test methods (ICCVAM, 2003) are excellent documents that provide very useful information for conducting validation studies. However, both these documents focus on broad issues and are written from a more general viewpoint. On the other hand, here, we describe the management strategies and tools for a validation study from a more practical viewpoint, arising from discussions regarding some validation studies that have been conducted in Japan. In particular, some of the authors who were involved in the interlaboratory validation study for alternatives to the Draize eye irritation test, organized by the Japanese Society of Alternatives to

Animal Experiments (Ohno et al., 1998), participated. This study was conducted on a large scale and evaluated 16 cytotoxicity tests as alternative tests. The total number of experimental laboratories participating in the study was 16–24 per cytotoxicity test. Large interlaboratory variations were obtained for all the cytotoxicity tests, and it was very difficult to interpret the data and evaluate the cytotoxicity tests based on the study results because there were many instances of violation of rules that had been finalized prior to the study and misinterpretation of the experimental protocols (Omori, 1998). To clarify the purpose of the validation study, i.e., evaluating the interlaboratory variations under the experimental protocol, to transfer the experimental operations for the tests correctly, and to try to ensure data quality should have been considered from planning stage of the study. The study demonstrated that an interlaboratory validation study is a joint venture by researchers having different backgrounds and levels of experience. In other words, study management of the validation studies became a challenging issue.

We admit that the strategies and tools described here do not cover all the aspects of study management and that the strategy and tools for other validation studies should be developed by considering individual cases and various viewpoints. However, our strategies and tools proved to be efficient for at least 2 validation studies, and we believe that they could serve as a reference for researchers conducting validation studies for a test method in the future.

It is important to note that in addition to the processes described in the experimental protocol adopted for a test method, there are many factors that can contribute to the occurrence of large interlaboratory variations. In other words, it is possible that variations could arise in an established test method even if the experimental protocol is well defined and the test is conducted under Good Laboratory Practice conditions. To exclusively evaluate the test method described in the experimental protocol, attempts should be made to eliminate additional factors that could cause interlaboratory variations. Large interlaboratory variations would lead to unclear results from the study and would delay the development of a test method even in case of a well-defined method.

In conclusion, management implies all the activities that are necessary to achieve objectives continually and efficiently. To obtain scientifically valid and distinct results from a validation study, appropriate study management from the planning stage is critical. The knowledge base on the management of validation studies should be expanded and shared.

## References

- Collins, J. F. (2001) Protocol, In *Biostatistics in Clinical Trials*, ed. by P. Armitage and T. Colton, pp. 373–377, John Wiley & Sons, West Sussex.
- ICCVAM. (2003) ICCVAM Guidelines for the Nomination and Submission of New, Revised, and Alternative Test Methods.
- OECD. (2002) Organization for Economic Co-operation and Development—OECD Guidelines for Testing of Chemicals. No. 429: Skin sensitization: Local Lymph Node Assay.
- OECD. (2005) Organization for Economic Co-operation and Development—OECD series on testing and assessment. No. 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment.
- Ohno, T., Asakura, M., Awago, T., Futamura, Y., Harihara, A., Hatao, M., Hattori, C., Hayasaka, A., Hayashi, M., Yahashi, T., Hirata, Z., Hori, H., Hoshi, H., Imai, K., Imazeki, I., Ishibashi, T., Itagaki, H., Iwata, T., Kakuma, M., Kaneda, S., Kato, I., Kato, M., Kawahatsu, T., Kawakami, A., Kazama, A., Kido, A., Kimura, S., Kitazawa, M., Kogiso, S., Kojima, H., Kotani, M., Kuramochi, M., Maki, D., Matsuda, M., Mitsuoka, C., Miyazaki, S., Mizuno, F., Mori, M., Morimoto, K., Moriysu, M., Nakajima, K., Nakajima, M., Nakamura, M., Nakamura, M., Nakano, N., Nakamura, S., Inegami, A., Nishino, M., Nishitomi, T., Ohkoshi, T., Okamoto, Y., Omori, T., Ono, H., Ono, M., Osanai, Y., Saijo, K., Sano, Y., Saotome, K., Sasaki, K., Sasaki, T., Sato, H., Sato, S., Shimada, H., Shimogo, S., Shimon, K., Shionoya, H., Sugawara, H., Sugiki, Y., Sugimoto, S., Sugimoto, S., Suzuki, J., Takagaki, K., Takahashi, K., Takizawa, M., Tamaki, C., Tanaka, N., Taniya, J., Teramoto, N., Torishima, H., Tsuchiya, T., Uejima, M., Ueno, H., Ugai, Y., Wada, S., Wakuri, S., Wang, X., Watanabe, I., Watanabe, M., Yajima, S., Yamagata, Y., Yamaguchi, Y., Yamakita, O., Yamamoto, R., Yoshida, M., Yoshimura, I., Yuhki, K., and Yukiya, S. (1998) Validation study on five cytotoxicity assays by JSSSE—I. Overview of the study and analyses of variations of ED<sub>50</sub> Values. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation* 5, 1–38.
- Omori, T., Saijo, K., Kato, M., Itagaki, H., Hayashi, M., Miyazaki, S., Ohno, T., Sugawara, H., Teramoto, N., Tanaka, N., Wakuri, S., and Yoshimura, I. (1998) Validation study on five cytotoxicity assays by JSAE—III. Quality of collected data files. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation* 5, 59–73.
- Yamashita, K., Idehara, K., Fukuda, N., Yamagishi, G., and Kawada, N. (2005) Development of a modified local lymph node assay using ATP measurement as an endpoint. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation* 11, 136–144.



# 皮膚アレルギーテストの結果をどう活かすか？

矢上 晶子, 松永 佳世子

本稿では、今回のテーマである皮膚アレルギーテストを、即時型(I型)アレルギーを検索するプリックテストならびにスクラッチテストと、遅延型(IV型)アレルギーを検索するパッチテストに分けて、基本的な手技をより実践的に述べる。

## 即時型(I型)アレルギー

即時型アレルギーの診断には、図1のフローチャートに示したように詳細な問診に加え、抗原の調製を含めた検査方法の選択、臨床経過を考慮した結果の解釈など、正しい診断を得るためにはさまざまな点に注意することが必要である。

### ① 即時型アレルギーの検査法

検査項目としては皮膚テスト(プリックテスト, スクラッチテスト, 皮内テスト), 抗原特異的IgE抗体測定(CAP-FEIA法, AlaSTAT法, LUMIWARD法など), ヒスタミン遊離試験, 除去試験・負荷試験などがあるが, 本稿では *in vivo* 検査である皮膚テストに焦点を当てて説明する。

### ② 即時型アレルギー検査の実際

皮膚テストが主に行われる疾患を図2にあげた。実際には図3に示すような順序で検査をすすめる。重篤な症状が誘発された症例や乳～小児例に対してはオーブ

ンテストから開始するが、濃度調整を十分に行えばプリックテストから開始しても問題はない。

### ③ プリックテスト/スクラッチテストの準備と手技

#### 1) プリックテスト

##### 1. 必要な器具の準備(図4)

プリックランセット(ewo care AB, Sweden, 日本では(株)ヤヨイ, TEL: 03-3813-5816で購入できる)(図4), 滅菌生理食塩水(生食), ヒスタミン二塩酸塩, 消毒綿, タイマー, 判定板(紅斑から膨疹を区別するためにはツベルクリン反応判定用硝子板がよい), プリックする部位に貼付するシール, ティッシュペーパー, 抗原(図2)などを準備する。

##### 2. 手技

#### ◆ 通常のプリックテストの場合(図5)

検査は前腕屈側で行う。各抗原の間隔は少なくとも3cm以上離して置き, 肘から3cm, 手首から5cm離す。ランセットはアレルギーごとに消毒綿で拭き, 1人の患者に対し1本を使用する。なお, 消毒綿に対してアレルギーや刺激反応を持つ患者に対しては蒸留水を用いる。

#### ◆ Prick to prick test

新鮮な材料を検査に用いる場合はprick to prick testを行う。果物(メロン, パイナップル, サクラソバなど)

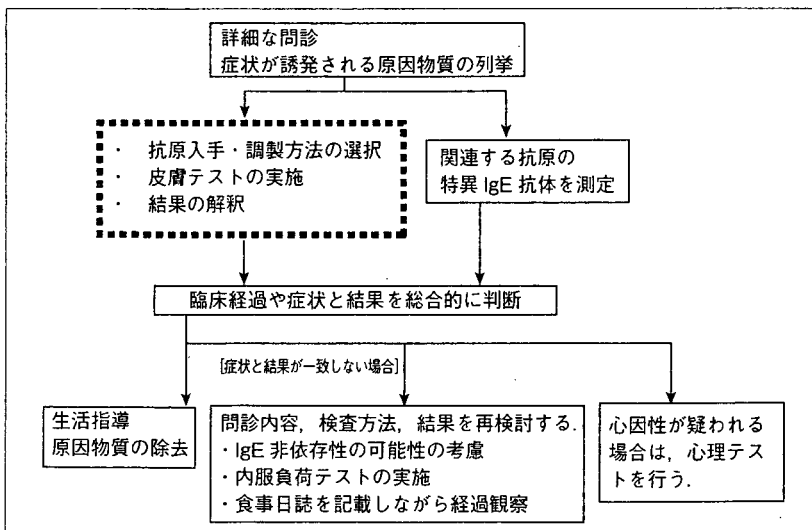


図1 即時型アレルギー診断のフローチャート

食物アレルギー： 臨床症状のある食物を持参（魚介類、卵、小麦など）

Pollen-food allergy syndrome：  
臨床症状のある新鮮な果物を持参、  
鳥居花粉シリーズ（シラカンバ、ヨモギなど）  
も同時に施行

ラテックスアレルギー：  
臨床症状が出現した天然ゴムラテックス製品・  
果物を持参、ラテックス粗抽出液、  
リコンビナント抗原

アレルギー性鼻炎： シラカンバ、ブタクサ、ヨモギなど  
花粉症

薬剤アレルギー： 被疑薬および類縁する薬剤

アトピー性皮膚炎： ダニ、真菌など

図2 プリックテストの抗原準備

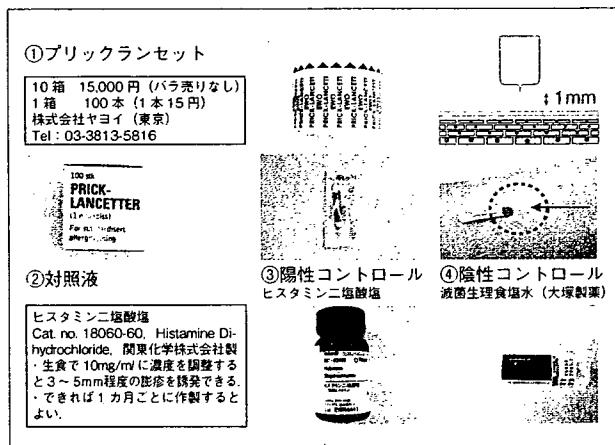


図4 プリックテストに必要なもの

①オープンテスト  
・ 皮疹のない患者前腕屈側にアレルゲンを塗布する。  
・ アナフィラキシーが誘発された患者に対して行うが、  
通常はプリックテストから開始する。

②プリックテスト  
・ 点状の傷をつけアレルゲンを浸透させる。

③スクラッチテスト  
・ 皮膚に出血しない程度の傷をつけてアレルゲンを浸透させる。  
・ 試験者により結果が異なる場合がある。

④即時型皮内テスト  
・ アレルゲン液 0.02 ml を前腕屈側の皮内に注射する。  
・ アレルゲンの調製や安全性の確保がむずかしい。

⑤内服負荷テスト  
・ アレルゲンを少量より実際に内服負荷する。

図3 即時型アレルギー検査の手順  
※下方へすすむにつれ、負荷するアレルゲン量が増え、アナフィラキシーを誘発する危険性が高まる。

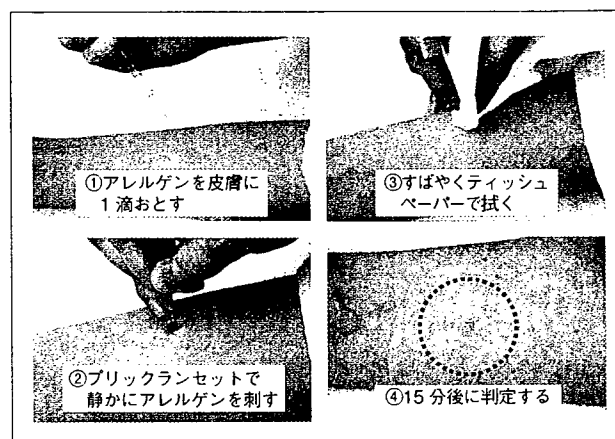


図5 プリックテストの手技

や野菜に直接プリックランセットを刺し、これを皮膚に垂直に刺す(図6)。

3. プリックテストの判定

15分後に膨疹の直径 mm（最長径とその中点に垂直な径の平均値）を測定する(図7)。対照液は陽性コントロールとしてヒスタミン二塩酸塩：10 mg/ml、陰性コントロールとして生食を用いる(図4)。ヒスタミンの2倍を4+、同等を3+、1/2を2+、1/2より小さく生食より大きいものを1+、生食と同等を(-)と判定する。判定結果2+以上を陽性とする。

2) スクラッチテスト(図8)

プリックテストが陰性の場合にはスクラッチテストにす

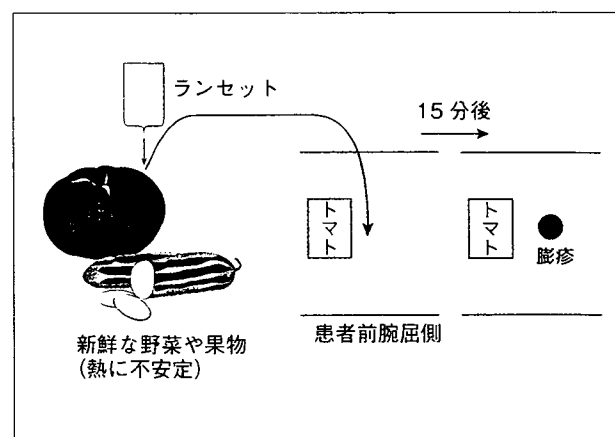


図6 Prick to prick test

すむ。この検査は、患者の前腕屈側にペンでマーキングした後、プリックランセットないしは細い注射針(23G)で、皮膚に対し出血しない程度に5 mmの線状の傷をつける。判定はプリックテストと同様である。

総

皮膚アレルギーテストの結果をどう活かすか？

	SCORE
・ヒスタミンの膨疹の2倍	4+
・ヒスタミンと同等の膨疹	3+
・ヒスタミンの1/2の膨疹	2+
・1/2より小さく、生食より大きい膨疹	1+
・生食と同等	(-)

15分後に膨疹の直径mm(最長径とその中点に垂直な径の平均値)を測定し、紅斑は判定対象としていない。

判定結果が2+以上を陽性としている。

対照液が入り困難な場合は、3mm以上の反応を陽性と判定してもよい。  
Dreborg, S. et al.: Allergy 47:48, 1993

図7 プリックテストの判定

■ 既往歴を詳しく聞き、全身症状が出現した症例には抗原抽出液の稀釈系列をつくること

■ 偽陰性、偽陽性に注意すること

(a) 偽陰性を回避するために………1) 患者に内服薬を中止することを指示すること(抗アレルギー薬は3日間の休薬期間が必要)。  
2) 同一部位でくり返しテストをしない。

(b) 偽陽性を正しく判断するために………1) 再テストを行うこと。(主に機械性蕁麻疹など)  
2) アレルゲンの調製を工夫すること。  
3) 負荷テストを試みること。

■ 標準化されていないアレルゲンのテストでは、5名程度のコントロールをとること。

■ 常にアナフィラキシー反応のリスクを考慮し、対応できる準備が必要である。緊急時にエピネフリンの筋肉内注射や点滴を行えるように常備しておく。

図9 プリックテストのこつ

①ブリックランセットもしくは細い針で皮膚に線状の傷をつける(約5mm)

②ティッシュペーパーで拭く

③アレルゲンをのせる

④15分後に判定する

・出血しない程度に傷をつける。  
・刺激反応や傷害反応が出現したり、試験者により反応が異なる場合がある。

図8 スクラッチテストの手技

① 背部(傍脊椎部)の皮膚病変のない皮膚にアレルゲンを閉鎖貼付する。

↓

② 48時間後にパッチテストユニットを除去し、絆創膏による圧迫刺激の影響がなくなる約1時間後に48時間後判定を行う。

↓

③ 以降、72時間後、さらに1週間後判定を行う。

・金属アレルゲンの刺激反応とアレルギー反応の鑑別に注意。  
・ステロイド主薬、アミノグリコシド系抗生物質の反応のように陽性反応が遅く出現する場合は1週間後判定が必須である。

図10 単純パッチテスト(48時間 closed test) アレルゲンの貼付および判定時間。

④ 結果の解釈

皮膚テストで得られた結果は、臨床経過やこれまでの既往歴なども含めて考慮し解釈しなくてはならない。また、反応が陰性であっても、即座に「アレルギー反応ではない」と判断せず、アレルゲンを正しい濃度で作製し適切に検査したかなどを検証する必要がある。図9にプリックテストのこつをあげた。

⑤ 即時型アレルギーおよびアナフィラキシーへの生活指導

即時型アレルギーと診断した患者への生活指導として、(1)原因食物の摂取、製品への接触を避けること、(2)予期せぬ蕁麻疹や呼吸困難に備えて抗ヒスタミン薬・経口ステロイド薬を処方し、常時携帯すること、(3)食物や薬物によっては交叉反応があることなどを中心に説明する。

注意する点は疾患ごとに異なるため、当科では生活上の注意点を記載した疾患ごとの情報カードを渡している。各疾患に対する具体的な対策については各項目を参照していただきたい。

遅延型アレルギー

① 遅延型アレルギー検査(パッチテスト)の実際

接触皮膚炎に対してパッチテストを行う。

② パッチテストの準備と手技

1) 単純パッチテスト(closed patch test)

背部(傍脊椎部)の皮膚病変のない皮膚に抗原を閉鎖貼付する。抗原準備や手技は図10、11に示した。

2) オープンテスト, Repeated open application test (ROAT)

染毛剤、パーマ液、脱毛クリーム、揮発性の製品は原



① アレルゲンの管理 …… 各シリーズごとに、4℃の冷蔵庫で保管

② 標準アレルゲンのシリーズ …… ジャパニーズスタンダードシリーズ  
化粧品アレルゲンシリーズ 歯科材料シリーズ  
ステロイド外用薬シリーズ ステロイド主剤シリーズ  
シミ、日焼け止めシリーズ など

③ パッチテストユニット  
当科では Scanpor tape (Norgesplaster, Norway: 大正製薬) 上に Finn Chamber\* (Epitest, Finland) がついているユニットを用いている。他にもパッチテスト用絆創膏 (鳥居薬品・東京) が販売されている。

図 11 パッチテストの抗原準備

時に 1 日 2 回アレルゲンを反応が出現するまで、あるいは反応が出現しなくても 5 日間は連続して塗布し、紅斑、浮腫、丘疹がないか判定する。もし反応がなければ、接触皮膚炎をおこした部位に同様の方法でアレルゲンを塗布する。

【適応疾患】

- ・アトピー性皮膚炎などにおいて背部に湿疹病変があり、パッチテストが困難な場合
- ・使用可能な製品のスクリーニング
- ・パッチテストの反応が疑陽性の場合

ただし、一度に 2 種しか検査ができない。

図 13 その他のパッチテスト: ROAT (Repeated open application test)

・染毛剤、パーマ液、脱毛クリーム、揮発性の製品は原液のままオープンテストを行う。

・試料を直径 20 mm の円に単純塗布し、20 分から 30 分後に膨疹反応の有無を判定し、その後、48 時間、72 時間後に判定する。

ヘナエキス配合  
男女共用

図 12 その他のパッチテスト: オープンテスト

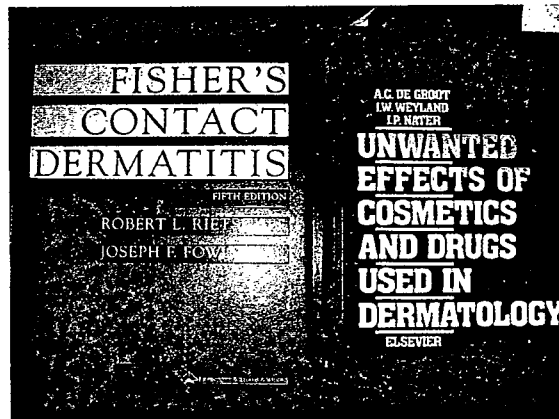


図 14 参考図書例 (左: Fisher's Contact Dermatitis 5th ed, Lippincott Williams & Wilkins. 右: Unwanted Effects of Cosmetics and Drugs used in Dermatology, Elsevier Science)

液のままオープンテストを行う (図 12)。その他のパッチテスト方法として ROAT を図 13 に示した。

③ アレルゲンの入手方法

代表的なパッチテスト用アレルゲンは数社から市販されており、本邦で入手できるものは以下のとおりである。

Brial (Germany) のアレルゲンは海外技術交易 (TEL: 03-3275-3461) より入手可能である。また、国産のアレルゲンは、鳥居薬品株式会社にて入手可能である。入手できない製品の成分などは、Contact Dermatitis などの本や参考文献 (図 14) により適切な希釈方法や濃度を確認し作成するが、安全が確認できないものについては感作させてしまう可能性などの危険性があるため貼付しない。

④ 各抗原の希釈と貼付方法

ここでは代表的な抗原について簡単に図 15、16 に示

した。詳細については各項を参照していただきたい。

⑤ 貼付前の注意点

パッチテストを行う前に、患者には以下の注意点を説明する。

- (1) パッチテストを行うことで感作をおこす可能性があること。
- (2) 患者の湿疹病変を再燃させることがあること。
- (3) 反応が強く、アレルゲンの貼付部位に水疱などが出現することがあること。
- (4) パッチテスト後に色素沈着や色素脱失を来すことがあること。

当科では上記の事柄を詳しく説明し同意を得たうえで、検査を開始している。

⑥ 判定基準

判定基準は 2 通り (国際接触皮膚炎研究会: ICDRG

総論

皮膚アレルギーテストの結果をどう活かすか？

① 外用薬、点眼液、食品、衣類などの場合  
直接 Finn Chamber にアレルゲンを載せる。

② シャンプー、石鹸、洗顔料など水溶性の製品の場合

a. 一般名、商品名、販売会社名、LOT 番号などを判定用紙に記載する。

b. それぞれの製品を 1%水溶液に調製し、丸くかたどられた濾紙を水溶液に浸す。

Ex) 固形石鹸 → 削って → 微温湯で溶かして 1%水溶液を作成する。 → 濾紙

c. Finn Chamber のアルミ板にあらかじめ白色ワセリンを薄く塗り、その上に水溶液を含んだ濾紙をのせる。

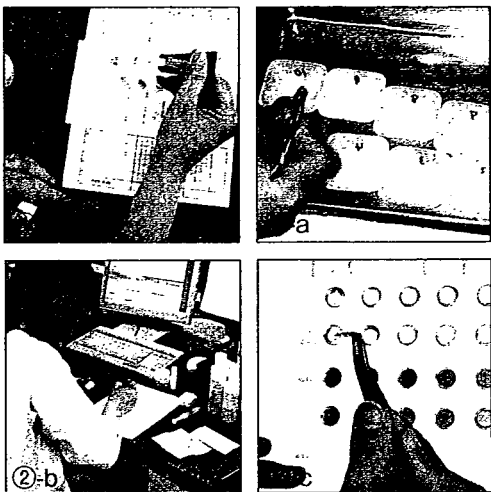


図 15 持参品のパッチテスト方法

① 農薬  
ワセリン、水ないしは親水ワセリンに使用濃度、10 倍稀釈濃度で混ぜて貼付する。

② 消毒薬  
使用濃度で貼付する。刺激性のあるものは使用濃度でのオープンテストを行う。  
使用テストも有用である。

③ 金属  
ヤスリで削りワセリンに混ぜて貼付する。

④ 植物  
花びら、葉、莖に分けてすり潰して貼付する。しかし、さくら草は強い感作性を持つのですり潰した後に水で 10 倍に稀釈して貼付する。刺激性のある植物は 10%水溶液またはエタノール、アセトンで抽出液を作る。

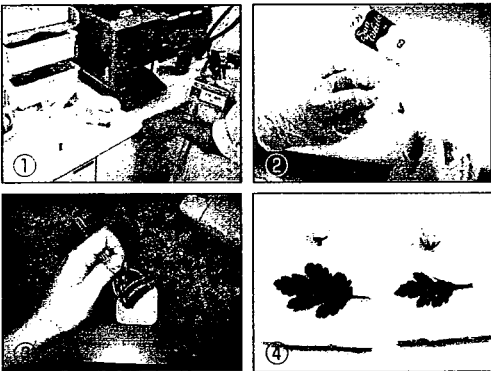


図 16 その他持参品の稀釈方法と貼付方法

基準と本邦基準) がある。アレルギーの判定には ICDRG 基準が適しているが、刺激反応を含めて判定する場合には本邦基準が適している (図 17)。

⑦ パッチテスト反応の解釈と注意点

パッチテストで得られた陽性反応をそのまま「陽性」と判断してはいけな。陽性反応を正しく解釈するためには、(1) 接触または使用歴を確認し、現在の皮膚炎の原因か、増悪因子かを明らかにする、(2) 今回接触した物質でなければ過去の皮膚炎の既往を十分に問診し、以前の皮膚炎の原因か、増悪因子かを明らかにする、(3) さらに、これまでの皮膚炎とは関係のない交叉反応である可能性を考慮する、といったことなどを検討することが大切である。

一方、パッチテストが陰性であっても、即座にアレルギー反応ではないと判断せず、アレルゲンを正しい濃度

で適切に貼付したかなどを検証するとよい。さらに、とくに強い陽性反応を呈したアレルゲンの近傍で非特異的に陽性反応が惹起されることがあり、これを excited skin syndrome とよぶ。この反応は多感作や交叉反応の判定と識別することが困難であるため、パッチテストの判定でもっとも注意を要する。

⑧ 診断


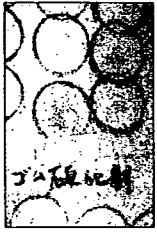
アレルギー性接触皮膚炎を診断する際には、発症経過、臨床症状、パッチテストの結果を考慮して診断を行う。

⑨ 患者への説明

患者へは、1 週間後判定時にパッチテストの結果を説明する。交叉反応するアレルゲンがある場合にはこれらも説明し、接触しないように注意する (図 18)。陽性反応を呈したアレルゲンが今回の皮膚炎と関連があったかを再度確認する。

本邦基準	反応	ICDRG 基準	反応
	刺激反応も含めて判定できる		アレルギーの判定に適している
—	反応なし	—	反応なし
±	軽度の紅斑	+?	紅斑のみ
+	紅斑	+	紅斑+浸潤、丘疹
++	紅斑+浮腫、丘疹	++	紅斑+浸潤+丘疹+小水疱
+++	紅斑+浮腫+丘疹+小水疱	+++	大水疱
++++	大水疱	IR	刺激反応
		NT	施行せず

ICDRG (国際接触皮膚炎研究班)

ICDRG 基準  
 ++: 紅斑+浸潤、丘疹  
 面積の50%は浮腫  
 あるいは浸潤を認める紅斑

図 17 パッチテストの判定基準

持参品については陰性の製品を報告し、今後の生活に役立てていただく(図 18)。持参品が陽性の場合、その製品の成分による再パッチテストが必要となることを説明し、準備をすすめる。また、代替品がある製品についてはそれらを紹介し、接触を回避するための防御対策についても指導する。もし、職業性の接触皮膚炎の場合には、患者の職場にパッチテストの結果を報告し、職場の異動を勧める。

接触皮膚炎についてより多くの情報を入手したい場合は日本接触皮膚炎学会のホームページが便利である(<http://www.fujita-hu.ac.jp/JSCD/>)。

**おわりに**

本稿では、実践的な皮膚テストの手技について述べた。個々の疾患については本誌の各項目を参考にさせていただければ幸いである。

**JS-5**  
**ビニール・ラッカー・ミックス**  
**(PPD black rubber mix)**

あなたは、PPD black rubber mix にアレルギーです。この化学物質はゴム製造過程で使用される添加剤(酸化防止剤)であり、その構成成分のなかでも特にIPPDが強い感作力を持っています。主な含有製品としては、黒または灰色のゴム製品(黒いゴムのアタシ、手袋、靴底、ケツカ、ベルト、財布、時計のベルト、ウインドウフィルム、カーシート、タイヤ、ゴム、ニス、ニス(帆布)、フロン(靴、靴の補強のための粘着剤)、黒いゴムの手すりなど)、酸化防止剤、UV吸収剤、紫外線防止剤、乾燥剤などがあります。ヘアダイの成分のPPDと交叉反応することがあります。

(1997年3月31日作成)  
 藤田保健衛生大学皮膚科 藤田晶子

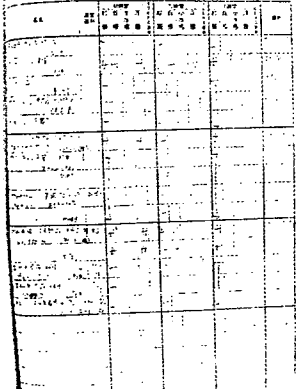


図 18 (左) アレルゲン説明カード、(右) 持参品結果一覧

**Key words**

皮膚アレルギーテスト、プリックテスト、パッチテスト

矢上 晶子 Yagami, Akiko

\* 国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部 / 藤田保健衛生大学医学部皮膚科  
 \* 〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1  
 E-mail: ayagami@nch.go.jp

松永 佳世子 Matsunaga, Kayoko

藤田保健衛生大学医学部皮膚科  
 〒470-1192 豊明市沓掛町田楽ヶ窪1-98

**case 15** PART.2 遅延型アレルギー ①アレルギー性接触皮膚炎

# 口紅



48歳，女性，1999年10月初診  
口唇に鱗屑を付着する紅斑があり，一部で亀裂を認める。

## 症例

症例：48歳，女性。

既往歴：四肢，耳介の接触皮膚炎（詳細不明），アレルギー性鼻炎。

現病歴：約10年前より，同一化粧品メーカーの口紅を使用していた。約1年前より，口唇に痒みを伴う皮疹が出現し，近医にて外用治療を受けたが，増悪と軽快をくり返すため，当院を受診した。

## 検査方法（パッチテスト方法）

患者が持参した口紅，ファンデーション，化粧水，乳液，保湿液は，そのまま貼付し，同時に化粧品に関連したアレルゲン20種も貼付した。陰性コントロールは白色ワセリンとした。Finn chamber<sup>®</sup> (Epitest Ltd Oy, Finland) on Scanpor<sup>®</sup> tape (Alpharma AS, Norway)を用いて，患者の背中に試料を48時間閉鎖貼付した。ユニット除去1時間後に48時間判定を行い，その後光アレルギーをスクリーニングするためにUVA 6 J/cm<sup>2</sup>を照射し，その24時間後に72時間判定を行った。また1週間判定も行った。判定はICDRG基準に基づき，72時間または1週間後に+以上を陽性とした。

づき，72時間または1週間後に+以上を陽性とした。

## 結果およびそれらの解釈

3種類の口紅とエステルガム（2% pet.）に陽性反応を認め（表1），口紅による接触皮膚炎と診断した。

## 原因物質の成分を用いたパッチテスト

メーカーより口紅の成分の提供を受け，成分パッチテストを行った。口紅AあるいはBの成分27種と，口紅Cの成分25種は分けて提供を受けた。各成分のパッチテスト貼付濃度は，成書<sup>1)</sup>に基づき，成書に記載のない成分は製品の配合濃度を参考に決定した。口紅A，Bの成分では，リンゴ酸ジイソステアリル（30% pet.），エステルガム・ミリスチン酸オクチルドデシル混合（0.1% pet.，1% pet.）に陽性であった。口紅Cの成分では，リンゴ酸ジイソステアリル（30% pet.）に陽性であった。その他の成分は，陰性であった（表2）。

以上の結果より，リンゴ酸ジイソステアリルおよびエステルガムが原因アレルゲンと考えた。ミリスチン酸オクチルドデシルは，単独の成分として提供が得られなかったため，原因アレルゲンであるか否かは不明である。