

when test chemicals and a negative control, respectively, are applied to the viable Vitro-life-Skin™ model, and A_{br} and A_{bc} are the values obtained for a blank test using a test chemical and the negative control, respectively, with a collagen sponge without cells.

Prediction models

Predictions of *in vitro* corrosiveness/non-corrosiveness were made according to the refined final prediction model (PM2) used in phase III of the EpiDerm™ skin corrosivity test (Liebsch et al., 2000). Hence, chemicals that reduced cell viability to less than 50% upon exposure to the Vitro-life-Skin™ model for three min. were predicted to

be 'corrosive' *in vivo*. If 3 min. exposure produced cell viability of $\geq 50\%$, the chemical was classified as 'non-corrosive' after a 3 min. exposure, but the same chemical was still be classified as 'corrosive' if viability after a 60 min. exposure was below 15%. The results obtained using the EpiDerm™ and Vitro-life-Skin™ models in this study were compared with the results of ECVAM validation studies using EpiDerm™ (Liebsch et al., 2000) and EPISKIN™ (Fentem et al., 1998) for skin corrosivity testing.

This test was repeated twice. If different results from the two tests were obtained, a third test was performed at each laboratory and used for final judgment.

Table 3 Data from each laboratory

Chemical Lab.	Potassium hydroxide (10%) Corrosive						Sulfuric acid (10%) Corrosive					Tetrachloroethylene Non-Corro				
	NIHS	NN	NS	NM	SC	IET	NIHS	NN	NS	NM	SC	NIHS	NN	NS	NM	IET
Blind No.	1	2	3	4	5	6	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
EpiDerm -test 1-	C	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	C	C	NC	NC	NC	NC	NC
EpiDerm -test 2-	C	C	C	C	C	C	NC	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC
EpiDerm re-trial	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Judges	C	C	C	C	C	C	NC	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC
Vitrolife-Skin -	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC
Vitrolife-Skin -	C	C	C	C	C	C	C	C	NC	C	C	NC	NC	NC	NC	NC
Vitrolife-Skin re-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Judges	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC

Chemical Lab.	Octanoic acid Corrosive					Potassium hydroxide(5%) Non-					Sodium hydroxide(4.88%) Corrosive				
	NIHS	NN	NS	NM	IET	NIHS	NN	NS	SC	IET	NIHS	NN	NS	SC	IET
Blind No.	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
EpiDerm -test 1-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
EpiDerm -test 2-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
EpiDerm re-trial	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Judges	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Vitrolife-Skin -	C	C	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	NC	C	C	C
Vitrolife-Skin -	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Vitrolife-Skin re-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Judges	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

Chemical Lab.	4-Amino-1,2,4-triazole Non-Corro.					Phosphoric acid Corrosive					L-Lactic acid Non-Corro.					
	NIHS	NN	NS	NM	IET	NIHS	NN	NS	NM	SC	IET	NIHS	NN	NS	NM	SC
Blind No.	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
EpiDerm -test 1-	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	NC	C	C	NC	C	
EpiDerm -test 2-	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
EpiDerm re-trial	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
Judges	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
Vitrolife-Skin -	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
Vitrolife-Skin -	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
Vitrolife-Skin re-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
Judges	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	

Chemical Lab.	Isopropanol Non-Corro.					Phenol Corrosive					Sodium perborate Non-Corro.					Chromium trioxide Corrosive				
	NN	NS	NM	SC	IET	NIHS	NN	NM	SC	IET	NIHS	NN	NS	NM	SC	NIHS	NS	NM	SC	IET
Blind No.	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
EpiDerm -test 1-	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C
EpiDerm -test 2-	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C
EpiDerm re-trial	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Judges	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C
Vitrolife-Skin -	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C
Vitrolife-Skin -	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C
Vitrolife-Skin re-	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C
Judges	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C	NC	NC	NC	NC	NC	C	C	C	C	C

Laboratory:

NIHS: Div. Toxicol., NIHS
 NS: ODAWARA Res. Center, Nippon Soda Co., Ltd.
 SC: Environmental Health Science Lab., Sumitomo Chemical Co., Ltd.

NN: Res. Div., Nihon Nohyaku Co., Ltd.
 NM: Res. Lab., Nippon Menard Cosmetic Co., Ltd.
 IET: Toxicol. Div., The Inst. Environmental Toxicol.

C: Corrosive, NC: Non-Corrosive

Results

This validation study was not performed under GLP. However, all data obtained in each laboratory followed GLP compliance and spirit. Their records (data and detailed documents) could be checked after the assays, and raw data was sent to Tokyo Univ. of Science for analysis by biostatisticians. All documents were checked by the chairperson, biostatisticians and chemical distributors, and are stored in the NIHS.

Predictivity

Using cell viability after exposure to test chemicals for three or 60 min., the chemical classifications

according to the EpiDerm™ prediction model are shown in Table 3. Data for positive controls in the two models were evaluated correctly at all laboratories. The EpiDerm™ data summarized in Table 4 excluded the positive control data. Of 30 classifications of six chemicals in the corrosive class, 29 classifications of EpiDerm™ were correctly predicted to be corrosive, and sensitivity was 96.7%. All six chemicals in the corrosive class were correctly predicted excluding one laboratory. Lab.1 gave a negative classification of sulfuric acid from two data sets, but this chemical is corrosive. Cell viability values after expose to sulfuric acid for 60 min. were 18.54% and 38.80%, and these values

Table 4 Contingency table for EpiDerm™ predictions

<i>Vitro</i> <i>Vivo</i>	Corrosive	Non-Corrosive
Corrosive	29	1
Non-Corrosive	10 (5% KOH, Lactic Acid)	20

Table 5 Contingency table for Vitrolife-Skin™ predictions

<i>Vitro</i> <i>Vivo</i>	Corrosive	Non-Corrosive
Corrosive	30	0
Non-Corrosive	10 (5% KOH, Lactic Acid)	20

Table 6 Key statistical parameters for the four tests

	EpiDerm™	Vitrolife-Skin™	EpiDerm™ (ECVAM)	EPISKIN™ (ECVAM)
No. of Chemicals	12	12	24	60
Sensitivity	100% (12/12)	100% (12/12)	92%	82%
Specificity	66.7% (4/6)	66.7% (4/6)	83%	84%
Accuracy	83.3% (10/12)	83.3% (10/12)	92%	83%
False positive rate	16.7% (2/12)	16.7% (2/12)	17%	19%
False negative rate	0% (0/12)	0% (0/12)	8%	14%

were slightly high compared to 15%, which is the border line. On the other hand, of 30 classification of six chemicals in the non-corrosive class, 20 classifications of EpiDerm™ were correctly predicted to be non-corrosive, and specificity was 66.7%, but two were false positives. There were 5% potassium hydroxide and lactic acid. All the laboratories gave them positive classifications from two data sets, which is a non-corrosive chemical. Positive predictivity was 74.4% (29 true corrosive classifications / 39 corrosive classifications in this assay). Negative predictivity was 95.2% (20 true non-corrosive classifications / 21 non-corrosive classifications in this assay). The total consistency rate was 81.7% (49 true classifications / 60 classifications in this assay).

The Vitrolife-Skin™ data are summarized in Table 5, excluding the positive control data. Of 30 classifications of six chemicals in the corrosive class, 30 of Vitrolife-Skin™ were correctly predicted to be corrosive, and sensitivity was 100%. All six chemicals in the corrosive class were correctly predicted.

On the other hand, of 30 classification of six chemicals in the non-corrosive class, 20 of Vitrolife-Skin™ were correctly predicted to be non-corrosive, and specificity was 66.7%, but two were false positives. They were 5% potassium hydroxide and lactic acid, which all laboratories gave a positive classification from two data sets. This chemical is non-corrosive. Positive predictivity was 75% (30 true corrosive classifications / 40 corrosive classifications in this assay). Negative predictivity was 100% (20 true non-corrosive classifications / 20 non-corrosive classifications in this assay). The total consistency rate was 83.8% (50 true classifications / 60 classifications in this assay).

Predictability of these two models was similar to the results obtained by the ECVAM validation study.

Intralaboratory variation

Most chemicals did not show any great differences in scores on tests repeated at each laboratory. Different classifications of EpiDerm™ accounted for 6.66% (4/60). These data are not shown in the Tables. Cell viabilities of sulfuric acid after exposure for 60 min. in Lab. 2 were 17.26%, 9.46% and 12.02%, and those in Lab.3 were 15.72%, 10.58% and 9.01%, respectively. On the other hand, cell viabilities of lactic acid after exposure for 60 min. in Lab. 1 were 16.55%, 13.39% and 7.19%, while

those in Lab.5 were 15.85%, 12.01% and 15.89%, respectively. These cell viabilities were around 15% after exposure for 60 min. (the success criteria).

Different classifications of Vitrolife-Skin™ accounted for 5.0% (3/60). Cell viabilities of sulfuric acid after exposure for 60 min. in Lab. 3 were 5.90%, 16.09% and 6.34%, while after exposure to octanoic acid for 60 min in Lab.3 were 21.37%, 11.77% and 10.71%. These cell viabilities were around 15% after exposure for 60 min (the success criteria). Meanwhile, cell viabilities of sodium hydroxide (4.88%) after exposure for 3 min. in Lab. 2 were also 55.12%, 15.41% and 17.51%. These cell viabilities were around 50% after exposure for 3 min. (the success criteria).

These cell viabilities were in an extremely narrow range despite the different classifications. Therefore, intralaboratory variation between the two models is presumed to be small.

Interlaboratory variation

In EpiDerm™, inter-laboratory variation was significant for only sulfuric acid. The classification of sulfuric acid in Lab. 1 was different from the data in the other four laboratories. In the data of Lab.1, not shown in the Tables, cell viabilities after exposure for 60 min. were 18.54% and 38.80%, and these values were almost the same as the positive classification. For Vitrolife-Skin™, inter-laboratory variation was not significant. From these results, the feasibility of using EpiDerm™ and Vitrolife-Skin™ was suggested by the experiment.

Discussion

From the obtained data, we confirmed the potential of using EpiDerm™ and Vitrolife-Skin™ as methods to evaluate the corrosivity of a chemical. We consider the data from these models has high predictivity, and low intra- and inter-laboratory variation.

With Vitrolife-Skin™, however, it is necessary to use limited blank data using collagen sponges without cells.

Modified points of Vitrolife-Skin™ from the ECVAM skin corrosivity validation study

Application volume

Although the surface of the Vitrolife-skin™ model (0.5 cm²) is similar to that of EpiDerm™ (0.63cm²), 50 μL of Liquid chemical was often insufficient for the surface. In this study, therefore,

the application volume of liquids was increased from 50 μ L, the volume used in the phase III protocol in the EpiDermTM skin corrosivity test, to 100 μ L. For the same reason, 50 mg of solid chemical was applied and 50 μ L of water was added to ensure good contact with the surface (in contrast to the Phase III protocol, in which 25mg of solid and an additional 25 μ L of water were applied. Additional tests using collagen sponges without cells, the Vitrolife-SkinTM model uses a collagen sponge without cells to construct the dermal layer, and this allows test chemicals to be easily absorbed and bound, compared with epidermal models consisting of only an epidermal layer and supporting material. In a previous study, tests using collagen sponges without cells, instead of non-viable Vitrolife-SkinTM models, were performed for several test chemicals with the potential to interfere with the MTT assay (Mirokawa, 2006). For 3-methoxypropylamine and n-heptylamine, these experiments suggested about 50-60% and 80% "viability", respectively, due to a chemical reaction with the MTT medium. Hence, the 70-80% viability obtained for 3-methoxypropylamine with the Vitrolife-SkinTM model should be corrected to about 20%. In the same way, the 120% viability obtained for n-heptylamine should be decreased to about 40%. Therefore, these two chemicals, which were incorrectly classified as negatives by testing without using blank collagen sponges, should correctly be classified as corrosive by adding blank collagen sponges, in agreement with the results from the EpiDermTM model. The additional test for the other six chemicals gave results of around 15% "viability", such that the Vitrolife-SkinTM *in vitro* prediction of corrosivity was not changed.

Therefore, we obtained blank data using collagen sponges without cells in the validation of Vitrolife-SkinTM. In this validation study, we detected solubilization, swelling and color change after exposure to chemicals, and the need to use blank collagen sponges without cells.

Comparison of skin models

As shown in Table 6, there was no difference in sensitivity, specificity, accuracy, false positive rate or false negative rate between EpiDermTM and Vitrolife-SkinTM in this validation study. The result in this validation study may be due to no difference in structure between a two-layer skin model consisting of a dermis and epidermis (Vitrolife-SkinTM) and epidermal models (EpiDermTM). The barrier

function of cornified layers of the cultured epidermal and skin model is less effective compared with human skin tissue (Kojima et al., 2000). In addition, as chemical exposure times become longer, stronger cytotoxicity occurs due to the accumulation of chemicals which permeate the cornified layer of the skin model. However, it is considered the barrier function of these model is similar.

The sensitivity was 92% in phase III of the EpiDermTM study and 82% in EPISKINTM study, and the present values (100%) were higher than data of these previous validation assays. The specificity, however, was 83% in phase III of the EpiDermTM study and 84% in the EPISKINTM study, and the present ones (66.7%) were lower than those. We consider these accuracy and false positive rates to be no different between the present validation and previous validation study. On the other hand, none of the false negative rates in present validation study were lower than data from previous validation studies. This issue must be handled carefully, because this assay is a catch-up validation trial, and the number of chemicals and classes is small.

Though peer review of these models is in progress, the ad hoc. committee of toxicology at MHLW in Japan has approved the utilization of these models to evaluate the corrosivity of a chemical.

Acknowledgment

This validation was funded by a grant from MHLW.

References

- Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile, D.J., Gardner J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc, M., Regnier, J.-F., Steiling, W., Walker, A.P. and Balls, M. (1995) A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 6. ATLA 23:219-255.
- Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals, Toxic. in Vitro, 12, 471-482.
- EC (2000) Annex I to Commission Directive 2000/33/EC of 25 April 2000 adapting to technical progress for the 27th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the

classification, packaging and labeling of dangerous substances, Official Journal of the European Communities, L136, 91-97.

Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D. J., Holzhütter, H.-G., and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, Toxic.in Vitro, 12,483-524.

ICCVAM (2002) NIH Publication No.02-4502 ICCVAM evaluation of EPISKIN™, EPIDERM™(EPI-200) and rat skin transcutaneous electrical resistance (TER) assay.

Kojima, H., Katada, T., and Konishi, H. (2000) Which cytotoxicity tests are useful for prediction of skin irritation by surfactants?, Altern. Animal Test. Experiment, 6, 79-88.

Liebsch, M., Traue, D., Barrabs, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M., and Holzhütter, H.-G. (2000) The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin corrosivity testing, ATLA, 28, 371-401.

Morikawa N., Morota, K., Morita, S., Kojima, H., Nakata, S., and Konishi, H. (2002) Prediction of human skin irritancy using a cultured human skin model: comparison of chemical application procedures and development of a novel chemical application procedure using the Vitrolife-Skin™ model, Altern. Animal Test. Experiment, 9, 1-10.

Morikawa N., Morota, K., Suzuki, M., Kojima, H., Nakata, S., and Konishi, H. (2005) Experimental study on a novel chemical application procedure for in vitro skin corrosivity testing using the Vitrolife-Skin™ human skin model, Altern. Animal Test. Experiment, 11, 68-78.

Morota, K., Morikawa, N., Morita, S., Kojima, H., and Konishi, H. (1998) Development and evaluation of the cultured skin model, Tiss. Cult. Res. Commun., 17, 87-93.

Morota, K., Morikawa N., Morita, S., Kojima, H., and Konishi, H. (1999) Alternative to primary Draize skin irritation test using cultured human skin model: comparison of six end points, Altern. Animal Test. Experiment, 6, 41-51.

OECD guideline for the testing of chemicals (2004) Draft proposal for new guideline: 430, *In vitro* skin corrosion: Transcutaneous electrical resistance test (TER).

OECD guideline for the testing of chemicals (2004) Draft proposal for new guideline: 431, *In vitro* skin corrosion: Human skin model test.

(Received: October 24, 2007/

Accepted: January 25, 2008)

Corresponding author:

Hajime Kojima, Ph.D.

Japanese Center for the Validation of
Alternative Methods (JaCVAM),

National Institute of Health Sciences (NIHS),
1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501,
Japan

Tel: +81-3-3700-9874

Fax: +81-3-3700-9874

E-mail: h-kojima@nihs.go.jp

アレルギー vs トキシコロジー

われわれを取り巻く環境には、免疫系に影響を与える物質が多く存在している。そのなかで、アレルギーに対する取り組みは進展してきたが、トキシコロジーについては十分な取り組みがなされてきたとはいえない。今回は、アレルギーとトキシコロジーの概念および接点を確認しながら、現在に至る経緯と今後の課題について考えてみたい。



わが国においては、
アレルギーに比べて
トキシコロジーに対する意識が
まだまだ低い状況です

言葉の概念と歴史および トピックス

●司会

松永佳世子 (写真中央)

藤田保健衛生大学医学部皮膚科学 教授

●ゲスト

相場 節也 (写真左)

東北大学大学院医学系研究科神経・感覚器病態学
皮膚科学 教授

小島 肇 (写真右)

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
薬理部 新規試験法評価室 室長

(発音順、敬称略)

撮影/畑 博己

松永(司会)——『皮膚アレルギーの旅』は2002年創刊以来年4回発行され、今までアレルギーに関するさまざまな情報を提供してきました。本来アレルギーとそうでない反応では何が違うのか、その両者のリスクを評価する方法は現在どこまで進んでいるのか、世界の情勢はどうか、そしてわが国が果たすべき役割は何なのか。今回は年初にあたりそのようなことを掘り下げてみたく、免疫毒性の研究を中心にご活躍の相場節也先生ならびに動物実験代替法の研究でご活躍の小島 肇先生を交えて「アレルギー vs トキシコロジー」と題して討議したいと思います。アレルギーとトキシコロジーがversusかandの関係かについてはいろいろな考え方があると思いますが、まず相場先生にアレルギーについての解説

をお願いします。

沼場——Allergology (アレロロジー) というのは、“-ology”という語尾が付いていることから「アレルギーを研究する学問」であり、具体的にはアレルギーの病態および診断・治療などについて研究するものといえるでしょう。現在アレルギーという言葉は「私は〇〇に対してアレルギーがある」というような形で一般的用語ともなっていますが、そもそも医学用語としてのアレルギーは、石坂公成先生が抗原に反応して生じるレアゲン抗体がIgE抗体であると発見された時点から始まり、CoombsとGellが〔アレルギー=過敏反応〕としてその発症機構の違いにより4型に類型化したことからアレルギーの概念が広がったように思います。

本来アレルギーとは、“自己”に対する過敏反応である自己免疫疾患とは対照的な概念で、動物性の蛋白質や他人の細胞あるいは化学物質など“非自己”に対して過敏に反応する状態と定義され、それを探求する学問がアレロロジーだと考えられます。過敏反応が起こる基礎にはやはり免疫反応が主として存在し、免疫学の進歩に伴ってアレルギーの考え方も変遷してきたわけですが、最近トピックスとして取りあげられているのがregulatory T細胞(制御性T細胞)です。免疫防御システムにおいてT細胞が防御ネットワークを構築することが知られていますが、このT細胞が自己組織を攻撃しないように制御しているのがregulatory T細胞であり、Foxp3とよばれるmaster gene regulatorにより制御されています。このregulatory T細胞が、自己免疫のみならずアレルギーにも深く関与しているのではないかと考えられ、今後の研究に期待が寄せられています。

松永——続いて小島先生に、トキシコロジーの概念や歴史あるいはトピックスについてお話いただきたいと思います。

小島——Toxicologyは毒物学・中毒学などと訳され、私たちの周りにあるさまざまな毒物を対象としてその作用あるいは生物活性などを研究する生化学、薬理学、病理学などを総括した学問です。いわば基礎的医学の上に成り立っている応用的学問で、欧米では広くかつ深く研究されて専門家も多く育っているのですが、わが国においてはトキシコロジーに対する意識がまだまだ低い状況です。活動主体としては、1973年設立の毒性研究会と1976年設立の毒作用研究会とが1981年に合体して日本毒科学会となり、これが1997年に「日本トキシコロジー学会」と改称され

「日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会」が相応しいと考えられています。



松永佳世子

まつなが かよこ

Profile

1976年名古屋大学医学部卒業。三菱名古屋病院研修医。1977年同大学皮膚科入局、研修医。1978～1980年名古屋保健衛生大学医学部皮膚科助手。1980～1991年名古屋大学医学部附属病院および分院医員。1991～2000年藤田保健衛生大学医学部皮膚科学講師。2000年～同教授。2007年～日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会理事長。

専門分野

皮膚アレルギー、接触皮膚炎の原因解明・防御

て現在に至っています。トキシコロジーに関する学会は、日本免疫毒性学会、日本産業衛生学会、日本毒性病理学会などもあり、多くの関係者が携わっていますが、残念ながら若い研究者が育っていない印象があります。

トキシコロジーは、サリン事件やタミフル®など何か問題が起こらなければ注目されない分野です。しかし、化粧品、医薬品、食品添加物、農薬、金属、化学薬品、環境汚染物質、産業廃棄物、放射性物質、化学兵器など広範な領域を対象としており、極めて



相場 節也

あいば・せつや

Profile

1980年東北大学医学部卒業後、同大学皮膚科入局。1983年同科助手。1987～1990年米国国立癌研究所 皮膚科部門留学。1991年東北大学医学部皮膚科講師。1998年同助教授。2003年東北大学大学院医学系研究科神経・感覚器病態学皮膚科学分野教授。

専門領域

乾癬、アトピー性皮膚炎、皮膚免疫、接触皮膚炎ならびに炎症性皮膚疾患の発生機序の解析、皮膚ランゲルハンス細胞の免疫学的解析

私たちが知らずに触れている化学物質が私たちの免疫系にどの程度影響を与えているかは全く未知なのです。

重要な意義を持っていることから最近ではマスコミでも取り上げられる機会が多くなってきました。

松永——私は2007年7～8月の2週間EUを訪れ、接触皮膚炎や食物アレルギーあるいはトキシコロジーを専門にしている臨床現場を視察してきました。そのなかで特に驚いたことは、スウェーデンのMalmö大学病院の皮膚科クリニックです(図1)。外来には20以上の診察室、診療室があり、下腿潰瘍などが洗える足洗い場のある部屋、narrow band UVBあるいはbroad band UVBなどのレーザー治療専用の部屋などが複数ある。そのクリニックとは別にoccupational dermatology(職業性皮膚科学)を主とするクリニックが研究所とともに併設されており、職場で問題になった化学物質を持っていくと直ちに分析・抽出して薄膜クロマトグラフとして検査・診断・治療あるいは予防対策に直結できるようになっている。つまり、アレルギーおよびトキシコロジーに研究所が併設され、皮膚科医に有機化学の研究者が付いて、そこでスウェーデンの職場の問題が即座に解決できるようになっているのです。そのような施設の存在もさることながら、そこで実験を行っている人や周囲の人たちの健康を守るためのリスク管理が徹底されていることにも驚かされました。その点ではわが国は立ち遅れており、現実的には複数の施設が連携を組むしかないのでしょうか、早急にできることから取りかからなければならないと考えさせられました。現在はインターネットもあれば航空便で簡単にものを送ることもできますので、国際的な連携を考えることも可能でしょう。



Malmö大学病院

薄膜クロマトグラフで分析し、プラスチックの上にスポットを作り、そのものを患者さんの背中でパッチテストできようになっている。左から松永教授、Magnus Bruze教授、有機化学者

免疫領域の研究あるいは
トキシコロジーの領域は、
今後新しい知見が明らかとなる
伸びゆく分野です

トキシコロジーと免疫毒性 および代替法

松永——わが国の皮膚科領域では、アレルギーについては多くの医師が十分認識して取り組んできましたが、トキシコロジーに関しては取り組まなければならない重要分野であるという認識が足りなかったように思います。今後これを啓発する場として「日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会」が相応しいのではないかと考えていますが、先生方はこの問題についてどのようにお考えでしょうか？

相場——現在は動物愛護に関する社会の関心が高く、2007年の「日本動物実験代替法学会」においても動物実験ができなくなることが大きな話題となっていました。ネズミなどの動物が自由に使えた状況では、仮に接触皮膚炎のメカニズムがわからなくても感作性試験は可能でしたし、ウサギの眼を使って刺激反応をみることも可能でした。ところが、動物実験の代替として *in vitro* あるいはハイスループットスクリーニングで何かを検証しようとするれば、対象であるメカニズムがわからないことには何も進まないのです。しかし、人間というのは障害が現れて進歩するもので、動物実験ができなくなると決まった途端にメカニズム解明に取り組む解決策を探ろうと研究努力を重ねる。ここが代替法学会の非常におもしろいところです。トキシコロジーについては、毒物の毒性をみるだけではなく、毒性を発揮するメカニズムを真剣に探求するレベルにきていると思います。

小島——同感です。実験動物は、人間と同じ生物だからそれで反応がみえたというブラックボックス型で評価するのですが、代替法の場合は作用機序やすでに明らかになっている知見に基づいて特性を評価しなければなりません。免疫領域の研究あるいはトキシコロジーの領域は、その作用機構の解明が重要な分野であり、今後新しい知見が得られればさらに伸びゆく分野です。「日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会」においては、トキシコロジーの分野、特に皮膚トキシコロジーにおける病態・診断・治療・予防などの研究をぜひとも行っていただきたいと思っています。

動物実験をやめた場合に代替法を組み込んで、
はたしてとれただけ国民の安全・安心を担保できるかが問題です。



小島 肇

こじま・はじめ

Profile

1983年岐阜大学・農学部農芸化学科卒業。同年日本メナード化粧品株式会社入社。1984～1986年国立遺伝学研究所・形質遺伝部留学。1996年長崎大学薬学部にて博士号取得。2005年国立医薬品食品衛生研究所入所。
学会活動：日本動物実験代替法学会 評議員（庶務・総務、理事、評議員）
日本トキシコロジー学会 編集委員
日本接触皮膚炎学会 評議員・共同研究委員、広報委員

専門分野

毒性学、変異原性、組織培養、バリデーション

相場——皮膚というのは大きな問題を含んでおり、アレルギー性の接触皮膚炎はもちろんのこと一次刺激性の接触皮膚炎ですらそのメカニズムは明らかではありません。“刺激性”には多様な要因があり、発症機序も異なれば産生されるサイトカイン・ケモカインのレベルも異なります。単にIL-1 α の測定やMTTアッセイ法で細胞増殖活性をみるだけでは解明し得ないところがあり、これから一次刺激性接触皮膚炎に取り組むのも案外おもしろいかもしれませんね。

松永——相場先生は、どうして免疫毒性の研究に深く

関わられるようになったのですか？

相場——最初に樹状細胞に関わったことでしょうか。接触皮膚炎における樹状細胞の動態を調べるに際して、まず蛍光顕微鏡を使って染めた表皮を観察した時にランゲルハンス細胞の美しさに胸を打たれ、また、化学物質を加えた時に*in vivo*で活性化する樹状細胞が意外とハプテン特異的であったことに関心が高まりました。やがて*in vitro*でも樹状細胞の研究ができるようになり、接触皮膚炎の発症機序を樹状細胞を使って解析してきました。一方、ディーゼルエンジン廃棄微粒子やホルマリンが免疫系のT細胞およびT細胞の転写因子におよぼす影響についても解析してきました。その解析方法がh-CLAT (human Cell Line Activation Test) の開発につながったのです。(図2)。

考えてみれば、私たちが知らずに触れている化学物質が私たちの免疫系にどの程度影響を与えているかは全く未知といつていい。ディーゼルエンジン廃棄微粒子の影響を科学的に解析した例は少なく、私たちの環境を取り巻くほかの多くの化学物質が大丈夫なのかを調べてすらいない。免疫毒性物質は野放しになっている。ではなぜ野放しになっているのかといえば、多くの感作があるにもかかわらずそれを簡易的に測定するアッセイ法がないのです。そのアッセイ法を開発するためには、免疫毒性の起こってくる機序を考えなければなりません。免疫毒性の基本形は、ある化学物質が加わった時に惹き起こされる細胞のstress responseが免疫系に影響を与えることです。1つひとつの化学物質により特殊性はありますが、基本的にはそのような細胞のstress responseを抑制することで免疫反応および免疫毒性が捉えられるのではないかと考えています。

松永——ありがとうございます。続いて、小島先生が代替法の研究に関わられた経緯および現状についてご紹介ください。

小島——代替法とは実験動物の福祉を目的とした3Rs (Reduction, Refinement, Replacement) のなかのReplacementにあたる「動物実験代替法」のことで、化粧品業界では特に注目されています。欧米では代替法を扱う専門行政機関が1991~1997年に設立されました。さらにEUでは、「化粧品の安全性評価のための動物実験を原則として2009年までに全廃するとともに、動物実験を行った化粧品の販売を禁止する」と法制化されたのです。化粧品は輸出入されていますし、国際ハーモナイゼーションの流れからもわが国として対策を講じないわけにはいかず、2005年国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター薬理部内にJaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) が設立され、代

替法の評価を進めていくことになりました。私は20年ほど一般企業に在籍していましたが、JaCVAM設立と同時に招かれ、現在は国内各学会や企業および国際的機関であるOECDやICHなどとの連携を図りながら、代替法に関する情報センターの役割を担って活動しています(図3)。

毒性のある物質が シグナル伝達分子に作用するか 否かがアレルギー反応の惹起に 関わってきます

トキシコロジーとアレルギーの 接点と今後の課題

松永——アレルギーとトキシコロジーのメカニズムを考えた場合、両者には類似点と相違点がみられますが、相場先生はどのようにお考えですか？

相場——トキシコロジーの領域である毒性物質について、この物質がsignal transductionの分子に作用するか否かがアレルギー反応の惹起に関わってきます。例えば、樹状細胞が活性化されるために必須なシグナル分子としてNFκBやMAPキナーゼp38がありますが、接触皮膚炎を起こすハプテンなどの毒性物質がたまたまこれらのシグナル分子に作用を及ぼすことが考えられ、この時点でトキシコロジーとアレルギーとは接点を持つことになります。ただ、毒性物質のどのような特性が皮膚刺激に関連しているかについては、現在のところ全く未知だと思います。

小島——例えば皮膚が赤くなる症状があるとします。その原因がわからなければまた症状を繰り返すことになってしまいますから、それぞれの物質の皮膚刺激やアレルギーに対する反応を検討しなければなりません。ところが、アレルギーや皮膚刺激などで皮膚が赤くなる程度の研究には国からの支援がほとんど望めませんし、研究者も予算の少ない分野には寄り付きません。皮膚に何か症状を起こす物質は生体にもよからぬ影響を及ぼすかもしれず、実際に肝障害や腎障害が起こってからキャッチしていたのでは、本当の意味での安全性の担保はできません。

相場——皮膚科の臨床現場においては、医療費および人や材料の問題からパッチテストひとつ満足に行うことができません。病院経営からすればパッチテストよりも手術が求められ、厚生労働省ですら採算の

合わないものについては切り捨てる方針です。採算優先で臨床研究は疎かにならざるを得ず、医療に携わる人にとっても患者にとっても望ましい医療とは程遠い状況に陥りつつあります。

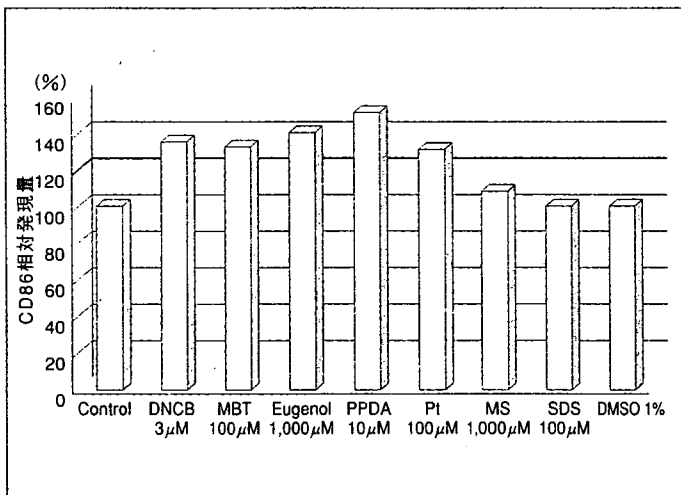
松永—このような状況の中では、アレルギーやトキシコロジーに関する有用なシステムを単独施設で組み立てることは難しく、行政と臨床が協力して全国ネットを組むしかありません。できれば1箇所集中してセンター化すれば、困った患者や情報、ものなどが集まり、先述したスウェーデンの皮膚科クリニックのような施設に近づくとと思いますが、問題は予算です。

小島—わが国の分析技術などは決してスウェーデンなどに劣っているわけではありませんし、企業内や受託で分析に携わっておられる方の中には優秀な研究者が大勢おられます。「日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会」が日本化学工業協会やコスメトロジー研究振興財団などと予算およびマンパワーの面でタイアップしていくことで、システム作りの可能性が

みえてくるのではないのでしょうか。

松永—小島先生は、このような現状においてわが国がどのような役割を果たせるとお考えですか？

小島—代替法に関してはEU主体で展開されていますので、世界のバランスの中でわが国の果たすべき役割を模索しているところです。例えば、相場先生が開発された*in vitro*感作性試験法 (h-CLAT) は世界の先端技術の1つですから、この試験系でわが国が世界をリードできれば刺激やアレルギー反応の原因探求面において重要な役割を担っていけないのでしょうか。ただ、化粧品の場合はアレルギー物質を含有させないという考え方でいいのですが、問題は医薬品です。薬効のあるものにアレルギーがあったとしても、それが有用であれば使わないわけにはいかない。動物実験ができなければ代替法によるわけですが、h-CLATだけではリスクアセスメントとしての曝露評価や濃度依存性評価をできませんので、その点を解決する方法を次に開発していかなければなりません。例えば、樹状細胞を取り込んだ皮膚

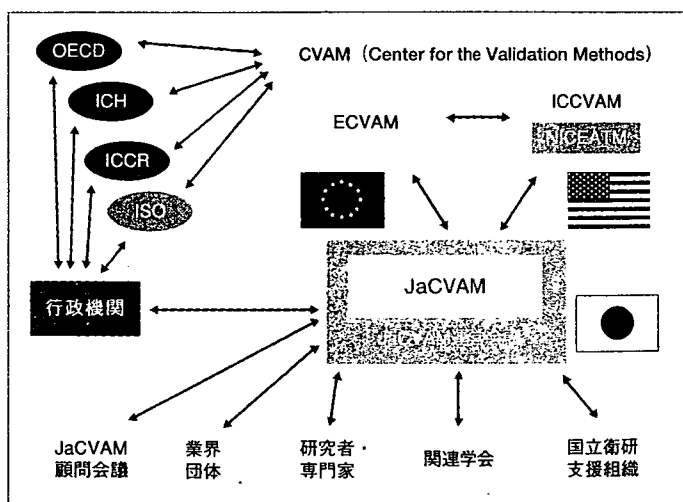


化合物のTHP-1細胞CD86発現に対する影響 (h-CLAT)

それぞれの化合物 (カッコ内はLLNAによる感作性評価) をTHP-1細胞に24時間処理し、CD86の発現量をフローサイトメトリーにより測定してコントロールと比較した。その結果感作性物質により120%以上の発現亢進を示した。

DNCB : 2,4-Dinitrochlorobenzene (extreme), MBT : 2-Mercaptobenzothiazole (moderate), Eugenol (weak), PPDA : 1,4-Phenylenediamine (strong), PT : Ammonium tetrachlorplatinate (sensitizer), MS : Methyl salicylate (non-sensitizer), SDS : Sodium dodecyl sulfate (non-sensitizer), DMSO (non-sensitizer, vehicle)

(Ashikaga T, et al : Toxicology in Vitro 16 : 711-716, 2002より改変)



JaCVAM運営組織図

ECVAM : European Center for the Validation of Alternative Methods
 ICCR : International Cooperation on Cosmetics Regulations
 ICCVAM : Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
 ICH : International Conference on Harmonization
 ISO : International Organization for Standardization
 JaCVAM : Japanese Center for the Validation of Alternative Methods
 NICEATM : National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods
 OECD : Organization for Economic Co-operation and Development

モデルであれば、アレルギー物質のリスクアセスメントができますから、これをいかに作製するかというサイエンスの発展が重要になってきます。そのために、幹細胞研究の成果を皮膚モデルの構築につなげるような研究を継続して行わないことには、医薬品業界あるいは医療全体のリスクアセスメントにつながる議論にならないのです。

松永——最後になりましたが、2008年年頭にあたり、先生方の課題あるいは抱負をお聞かせください。

小島——動物実験をやめた場合に代替法を組み込んで、はたしてどれだけ国民の安全・安心を担保できるかが問題です。医薬部外品には安全性試験のガイドラインがあり、医薬品にも免疫毒性試験といったガイドラインがありますが、それに動物実験の3Rsをどのように加味して現在の安全性の質を保つかというところを、多面的、根本的に議論しながら長期的な方向性を見定めていかなければなりません。その議論が盛んになり成熟していくという意味で、2008年は非常に重要な年であると思っています。

相場——最近、皮膚科に「環境」を冠したenvironmental dermatology（環境皮膚科学）が話題になっています。皮膚というものは常に環境の影響を受けている臓器であり、環境が細胞にどのような影響を与えるのかという研究にはまだ多くの未解決の問題が残されています。私は、その中でも特に免疫を柱としてもう少し免疫毒性のメカニズムに迫ってみたいと思っています。

松永——私は、socio-dermatology（社会皮膚科学）として、もっと外に開かれた皮膚科を目指したいと考えています。その魁として、臨床で接触皮膚炎に取り組んできた経験を活かし、今回話題に上ったアレルギーあるいはトキシコロジーの分野におけるネットワークあるいはオンラインシステム作成の準備に取り掛かりたいと思います。本日は、貴重なご意見をいただきありがとうございました。

(2007年9月1日収録)

座談会を振り返って



松永佳世子

EUでは、接触皮膚炎などの健康被害制御のために世界に先駆けて化学物質の安全性を見据えた対策がとられている。今回の座談会では、相場先生、小島先生とともにわが国における免疫毒性、毒性学領域の現状と展望について率直に語り、今後、化学物質の毒性・感作性制御には産学官のネットワーク作りが急務と再確認した。



相場節也

今回、松永先生には、アレルギー vs トキシコロジーというおもしろいテーマで座談会を企画していただき感謝いたしております。皮膚は、外界に直接接触する数少ない臓器の1つであり、同時に発達した免疫器官でもあります。したがって、皮膚では、化学物質による毒性が免疫担当細胞の働きを加味して現れてきます。その意味では、この両者は、これからも皮膚科研究の大きなターゲットで有り続けると思います。



小島 肇

本座談会は、自分自身の仕事やトキシコロジーを見つめ直すよい機会でした。この機会をお与え頂きました松永先生に感謝しています。動物愛護はもちろん大切ですが、国民の安全・安心を守ること、国益を求めて国際協調を進めることも重要です。その意を汲み取って頂ければ幸いです。