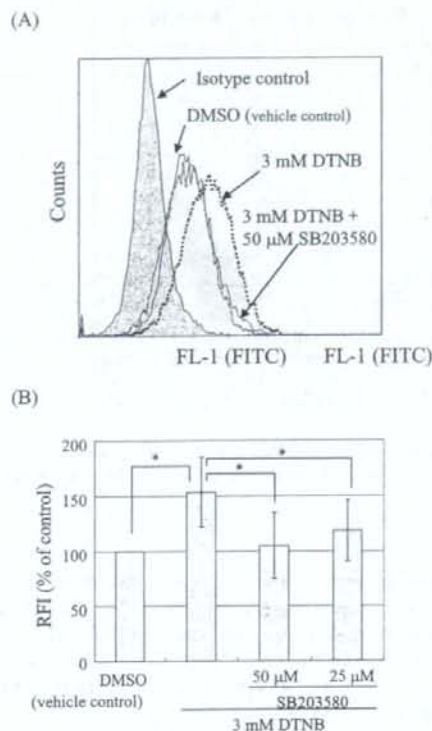


**Fig. 4.** Changes of cell-surface thiols and phosphorylation of intracellular p38 MAPK on THP-1 cells treated with a membrane-impermeable thiol blocker, DTNB. THP-1 cells were exposed to 3 mM DTNB for 2 hr and cell-surface thiols and phosphorylated p38 MAPK were analyzed as described in Materials and Methods. The flow-cytometric histograms (A) and RFI values (B) of THP-1 cells treated with 3 mM DTNB ((A) solid curve in (A) and 2,000 mg/ml DMSO (vehicle control, shaded curves in (A)). Each value of RFIs in (B) is the mean of  $\pm$  S.D. of three independent experiments. \* $p < 0.05$ . (C) Western blot analysis of intracellular phosphorylated p38 MAPK. Representative results of three independent sets are shown.

ed by treatment with DNCB, but not DNP-conjugated BSA or DNP-conjugated FBS. In *in vitro* studies, MHC class II internalization in hapten-treated Langerhans cells and CD86 expression in hapten-treated monocyte-derived dendritic cells were induced at sublethal concentrations of haptens (Becker *et al.*, 1992; Mizuashi *et al.*, 2005). However, we found that exogenous DNP-conjugated BSA and DNP-conjugated FBS, though not DNCB, were hardly toxic to THP-1 (Fig. 1). These observations supported the view that the trigger for activation of hapten-treated THP-1 cells is not hapten-conjugated protein.

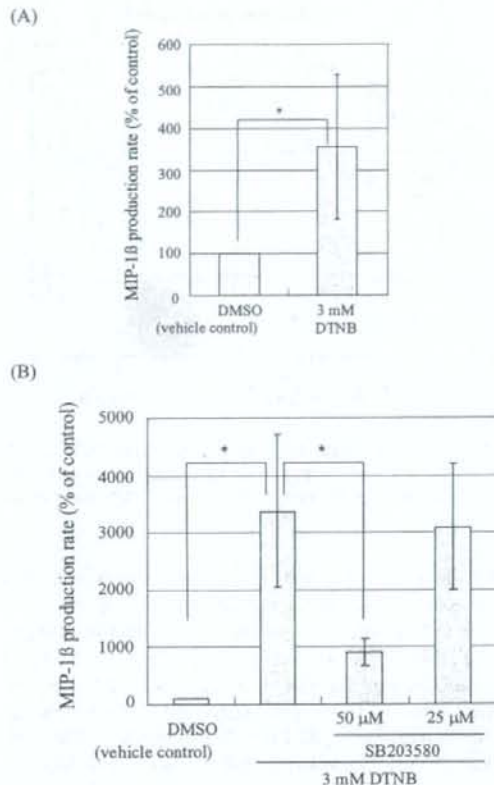
In general, the majority of haptens (or their metabolites) have electrophilic properties and are able to react with the side chains of many amino acids in proteins, including lysine and cysteine (Gerberick *et al.*, 2004). Intracellular GSH, which is a tripeptide including cysteine, plays a key role in regulating the intracellular redox balance. According to the report by Mizuashi *et al.* (2005), the intracellular reduced/oxidized glutathione (GSH/GSSG) ratio was reduced by treatment with haptens. Although attention has mostly been focused on intracellular redox regulation, including transcription factors (Schreck *et al.*, 1991) and signaling molecules (Le *et al.*, 2000), cell-surface thiols also play an important role in lymphocytes (Sahaf *et al.*, 2003). Cell-surface proteins such as receptors and transporters can activate intracellular signal transduction, and cell membranes, including cell-surface proteins, are physically the first point of contact with haptens for cells. Cell-surface proteins that can be modified by oxidoreduction include ion channels and the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor (Lipton *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2003). Oxidation of cell-surface proteins induces activation of ERK via the epidermal growth factor receptor and activation of Src family protein tyrosine kinases by clustering these proteins through disulfide bond cross-linking (Nakashima *et al.*, 2002; Midwinter *et al.*, 2004). Furthermore, Usatyuk *et al.* (2006) demonstrated that 4-hydroxy-2-nonenal induced phosphorylation of p38 MAPK and protein modification via oxidative stress. We therefore hypothesized that small-molecular chemicals such as haptens directly activate cells, and that cell-surface proteins might act as sensors for cell activation. In this study, we demonstrated that cell-surface thiols, but not amines, were decreased by sensitizers (DNCB and NiSO<sub>4</sub>), but not by a non-sensitizer, SDS, and also that p38 MAPK was more highly phosphorylated after DNCB and NiSO<sub>4</sub> treatment than after SDS treatment. The change of cell-surface thiols thus appeared to be associated with phosphorylation of p38 MAPK. DNCB and NiSO<sub>4</sub>, which decreased at least cell-surface thiols, have been reported to aug-

## Modification of cell-surface thiols elicits activation of THP-1 cells



**Fig. 5.** CD86 expression on THP-1 cells treated with DTNB and effect of an inhibitor of the p38 MAPK pathway (SB203580). THP-1 cells were exposed to 3 mM DTNB with or without 50 mM SB203580 for 48 hr and CD86 expression was measured by flow cytometry (A) (2,000 mg/ml DMSO (vehicle control) (solid line), 3 mM DTNB (thick dotted line) and 3 mM DTNB + 50 mM SB203580 (thin dotted line)). The histogram of the isotype control is drawn with shaded curves. Representative results of three independent sets are shown. Each value of RFIs in (B) is the mean of  $\pm$  S.D. of at five independent experiments. \* $p < 0.05$ .

ment CD86 expression, whereas SDS, which decreased cell-surface amines, was reported not to augment CD86 expression (Sakaguchi *et al.*, 2006). These observations are consistent with the report of Becker *et al.* (2003), who showed that tyrosine phosphorylation induced by haptens was blocked in the presence of cysteine, but not lysine. Furthermore, Filomeni *et al.* (2003) reported that modulation of cell-surface thiols by exogenous, membrane-



**Fig. 6.** MIP-1 $\beta$  production by THP-1 cells treated with DTNB and effect of an inhibitor of the p38 MAPK pathway (SB203580). THP-1 cells were exposed to 3 mM DTNB for 2 hr (A) and 48 hr (B) with or without 50 mM SB203580 for 48 hr and MIP-1 $\beta$  production was measured by ELISA. Each value of MIP-1 $\beta$  production is the mean of  $\pm$  S.D. of at five independent experiments. \* $p < 0.05$ .

impermeable GSSG triggered a decrease of intracellular glutathione (GSH) content, activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) and phosphorylation of p38 MAPK in U-937 cells. These observations and our data support the idea that changes of cell-surface thiols play a crucial role in the activation of the intracellular signal transduction pathway following hapten treatment. However, haptens may also have other effects. For example,

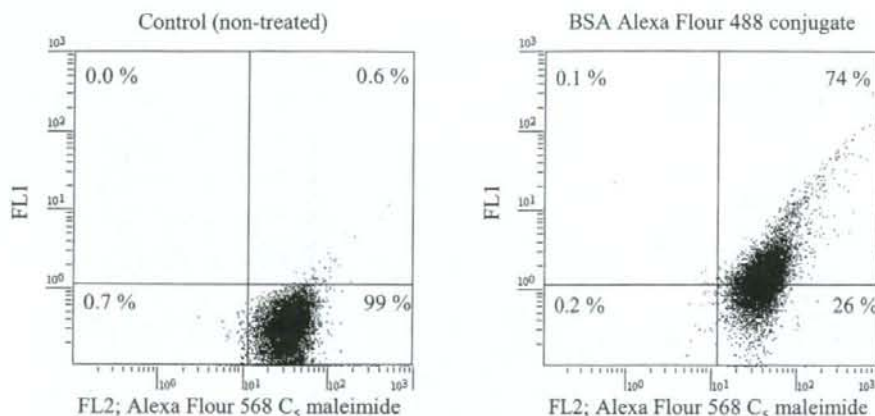


Fig. 7. Flow-cytometric dot-plots of THP-1 cells. THP-1 cells were exposed to 150 mg/ml BSA Alexa Flour 488 conjugate for 15 min and cell-surface thiols were analyzed as described in Materials and Methods. Numbers in each quadrant represent cell percentages. Representative results of three independent sets are shown.

DNCB decreases not only cell-surface thiols, but also amines (Fig. 2) and DNP-conjugated protein of both cell-surface and cytoplasmic proteins were found in DNCB-treated THP-1 (Fig. 3). We found that THP-1 cells were activated through the p38 MAPK pathway, followed by augmentations of CD86 expression and MIP-1 $\beta$  production, upon treatment with a membrane-impermeable thiol blocker, DTNB. Considering that the increase of MIP-1 $\beta$  production by THP-1 cells was detected after 2 hr treatment with DTNB, activation of the signal transduction pathway appears to be an early response. These observations support the notion that cell-surface thiols are one of the triggers of activation through the p38 MAPK pathway in THP-1 cells treated with simple chemicals. This does not imply that hapten-conjugated proteins are not the sources of the peptides presented by antigen-presenting cells to T cells. We have shown here that THP-1 cells have endocytotic activity for BSA Alexa Flour 488 conjugate independently of changes of cell-surface thiols. We previously reported the augmentation of cathepsin B gene expression in hapten-treated THP-1 cells, based on microarray analysis (Hirota and Moro, 2006). Cathepsin B is involved in degradation of protein Ag and generation of peptide-receptive MHC class II molecules (Fiebiger *et al.*, 2001). It seems likely that spontaneously endocytosed antigen, such as DNP-conjugated BSA and DNP-conjugated FBS, is degraded by intracellular proteases in activated THP-1 cells.

In this study, we focused on THP-1, a human monocytic cell line, but it would be interesting to know whether

similar changes are found in antigen-presenting cells or not. Antigen-presenting cells have potent antigen-presenting functions and high endocytotic activity. Moreover, according to Filomeni *et al.* (2003), cytotoxic effects of GSSG on U-937, a monocytic cell line, differ from those on primary monocytes.

Recently, several groups have developed *in vitro* assays for predicting the sensitizing potentials of chemicals. Various biomarkers related to activation (maturation), migration and antigen-presentation of antigen-presenting cells have been used as targets. High sensitivity and an easy detection procedure are two of the most important requirements for *in vitro* assays. An assay detecting cell-surface thiols by flow cytometry would be straightforward. Thus, we are evaluating changes of cell-surface thiols as a candidate biomarker for an *in vitro* sensitization assay by using about thirty chemicals, including skin sensitizers and non-sensitizers (Suzuki *et al.*, in press). We think cell-surface thiols might be a good candidate for detecting activation of cells treated with haptens.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank Richard Steele for critical review of the manuscript.

#### REFERENCES

- Aiba, S. and Katz, S.I. (1990): Phenotypic and functional characteristics of *in vivo*-activated Langerhans cells. *J. Immunol.*, **145**,

## Modification of cell-surface thiols elicits activation of THP-1 cells

- 2791-2796.
- 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. *Eur. J. Immunol.*, **27**, 3031-3038.
- Aiba, S. and Tagami, H. (1998): Dendritic cell activation induced by various stimuli, e.g. exposure to microorganisms, their products, cytokines, and simple chemicals as well as adhesion to extracellular matrix. *J. Dermatol. Sci.*, **20**, 1-13.
- Aiba, S., Manome, H., Nakagawa, S., Mollah, Z.U., Mizuashi, M., Ohtani, T., Yoshino, Y. and Tagami, H. (2003): p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct role in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl<sub>2</sub> and 2,4-dinitrochlorobenzene. *J. Invest. Dermatol.*, **120**, 390-399.
- Ashikaga, T., Hoya, M., Itagaki, H., Katsumura, 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. *Toxicol. 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: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro*, **20**, 767-773.
- Azam, P., Peiffer, J.L., Chamoussat, D., Tissier, M.H., Bonnet, P.A., Vian, L., Fabre, I. and Ourlin, J.C. (2006): The cytokine-dependent MUTZ-3 cell line as an *in vitro* model for the screening of contact sensitizers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **212**, 14-23.
- Becker, D., Kolde, G., Reske, K. and Knop, J. (1994): An *in vitro* test for endocytotic activation of murine epidermal langerhans cells under the influence of contact allergens. *J. Immunol. Method*, **169**, 195-204.
- Becker, D., Mohamadzadeh, M., Reske, K. and Knop, J. (1992): Increased level of intracellular MHC class II molecules in murine Langerhans cells following *in vivo* and *in vitro* administration of contact allergens. *J. Invest. Dermatol.*, **99**, 545-549.
- Becker, D., Valk, E., Zahn, S., Brand, P. and Knop, J. (2003): Coupling of contact sensitizers to thiol groups is a key event for the activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.*, **120**, 233-238.
- Coutant, K.D., de Fraissinette, A.B., Cordier, A. and Ulrich, P. (1999): Modulation of the activity of human monocyte-derived dendritic cells by chemical haptens, a metal allergen, and a staphylococcal superantigen. *Toxicol. Sci.*, **52**, 189-198.
- Enk, A.H. and Katz, S.I. (1992): Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *PNAS*, **89**, 398-402.
- Filomeni, G., Rotilio, G. and Ciriolo, M.R. (2003): Glutathione disulfide induces apoptosis in U-937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. *FASEB J.*, **17**, 64-66.
- Fiebiger, E., Meraner, P., Weber, E., Fang, I.F., Stingl, G., Ploegh, H. and Maurer, D. (2001): Cytokines regulate proteolysis in major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by dendritic cells. *J. Exp. Med.*, **193**, 881-892.
- Gerberick, G.F., Vassallo, J.D., Bailey, R.E., Chaney, J.G., Morrall, S.W. and Lepoittevin, J.P. (2004): Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol. Sci.*, **81**, 332-343.
- Girolomoni, G., Cruz, P.D.Jr. and Bergstresser, P.R. (1990): Internalization and acidification of surface HLA-DR molecules by epidermal Langerhans cells: a paradigm for antigen processing. *J. Invest. Dermatol.*, **94**, 753-760.
- Hirota, M. and Moro, O. (2006): MIP-1beta, a novel biomarker for *in vitro* sensitization test using human monocyte cell line. *Toxicol. In Vitro*, **20**, 736-742.
- Hulette, B.C., Rowden, G., Ryan, C.A., Lawson, C.M., Dawes, S.M., Ridder, G.M. and Gerberick G.F. (2001): Cytokine induction of a human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1) to a CD1a<sup>+</sup> dendritic cell phenotype. *Arch. Dermatol. Res.*, **293**, 147-158.
- Kühn, U., Brand, P., Willemsen, J., Jonuleit, H., Enk, A.H., van Brandwijk-Petershans, R., Saloga, J., Knop, J. and Becker, D. (1998): Induction of tyrosine phosphorylation in human MHC class II-positive antigen-presenting cells by stimulation with contact sensitizers. *J. Immunol.*, **160**, 667-673.
- Laragione, T., Bonetto, V., Casoni, F., Massignan, T., Bianchi, G. and Gianazza, E. and Ghezzi, P. (2003): Redox regulation of surface protein thiols: identification of integrin alpha-4 as a molecular target by using redox proteomics. *PNAS*, **100**, 14737-14741.
- Lawrence, D.A., Song, R. and Weber, P. (1996): Surface thiols of human lymphocytes and their changes after *in vitro* and *in vivo* activation. *J. Leukocyte. Biol.*, **60**, 611-618.
- Le, F., Stomski, F., Woodcock, J.M., Lopez, A.F. and Gonda, T.J. (2000): The role of disulfide-linked dimerization in interleukin-3 receptor signaling and biological activity. *J. Biol. Chem.*, **275**, 5124-5130.
- Lipton, S.A., Choi, Y.B., Takahashi, H., Zhang, D., Li, W., Godzik, A. and Bankston, L.A. (2002): Cysteine regulation of protein function--as exemplified by NMDA-receptor modulation. *Trends Neurosci.*, **25**, 474-480.
- Midwinter, R.G., Peskin, A.V., Vissers, M.C. and Winterbourn, C.C. (2004): Extracellular oxidation by taurine chloramine activates ERK via the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.*, **279**, 32205-32211.
- Mizuashi, M., Ohtani, T., Nakagawa, S. and Aiba, S. (2005): Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.*, **124**, 579-586.
- Nakashima, I., Kato, M., Akhand, A.A., Suzuki, H., Takeda, K., Hossain, K. and Kawamoto, Y. (2002): Redox-linked signal transduction pathways for protein tyrosine kinase activation. *Antioxid. Redox Signal.*, **4**, 517-531.
- Reglinski, J., Hoey, S., Smith, W.E. and Sturrock, R.D. (1988): Cellular response to oxidative stress at sulfhydryl group receptor sites on the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.*, **263**, 12360-12366.
- Ryan, C.A., Gerberick, G.F., Gildea, L.A., Hulette, B.C., Betts, C.J., Cumberbatch, M., Dearman, R.J. and Kimber, I. (2005): Interactions of contact allergens with dendritic cells: Opportunities and challenges for the development of novel approaches to hazard assessment. *Toxicol. Sci.*, **88**, 4-11.
- Sahaf, B., Heydari, K., Herzenberg, L.A. and Herzenberg, L.A. (2003): Lymphocyte surface thiol levels. *PNAS*, **100**, 4001-4005.
- 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. *Toxicol. In Vitro*, **20**, 774-784.
- Schreck, R., Rieber, P. and Baeuerle, P.A. (1991): Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.*, **10**, 2247-2258.
- Suzuki, M., Hirota, M., Hagino, S., Itagaki, H. and Aiba, S. (2009):

- Evaluation of changes of cell-surface thiols as a new biomarker for *in vitro* sensitization test. *Toxicol. In Vitro*. (in press).
- Usatyuk, P.V., Parinandi, N.L. and Natarajan, V., (2006): Redox regulation of 4-hydroxy-2-nonenal-mediated endothelial barrier dysfunction by focal adhesion, adherens, and tight junction proteins. *J. Biol. Chem.*, **281**, 35554-35566.
- Verrier, A.C., Schmitt, D. and Staquet, M.J. (1999): Fragrance and contact allergens *in vitro* modulate the HLA-DR and E-cadherin expression on human epidermal Langerhans cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **120**, 56-62.
- 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. *Toxicol. In Vitro*, **17**, 221-228.
- Zeng, X.H., Xia, X.M. and Lingle, C.J. (2003): Redox-sensitive extracellular gates formed by auxiliary beta subunits of calcium-activated potassium channels. *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 448-454.

## 動物実験代替法への化粧品企業 における取り組み

板垣 宏

Hiroshi ITAGAKI

(株)資生堂品質評価センター主幹研究員

萩野滋延

Shigenobu HAGINO

(株)資生堂品質評価センター副主幹研究員

### 1 はじめに

昨今、「人権」という言葉が度々メディアに登場し社会における認識が深まりつつあるが、「動物の権利や福祉」<sup>1)</sup>については薬学を含めライフサイエンス研究に携わる方々にどのように捉えられているのであろうか。1999年の第3回国際動物実験代替法会議で採択された「ボローニャ宣言」<sup>2)</sup>は、ライフサイエンス研究における代替法の基本的な概念及び動物福祉をグローバルに普及させ、動物の福祉や動物実験に関わる法律の整備、さらには代替法開発を世界中で加速させている。本稿では、欧州連合(EU)の法規制などにより代替法開発が喫緊の課題となっている化粧品業界における一企業の取り組みを、その周辺を含めて紹介する。

### 2 化粧品に対する動物実験反対への動き

化粧品の安全性試験に対する反対運動は1980年代に、眼刺激性を予測するためのウサギを用いる Draize 試験や急性毒性を予測する LD<sub>50</sub> 試験を中心に日米欧においてはほぼ同時に活発化し、動物実験廃止へ向けた活動は化粧品業界にとって重要な課題となった(図1)。米国では、1989~1990年に幾つかの大手化粧品メーカーが動物実験廃止を新聞発表するに至った。欧州では1993年以降、EUにおける化粧品の法律である「化粧品指令」に動物実験の禁止(testing ban)

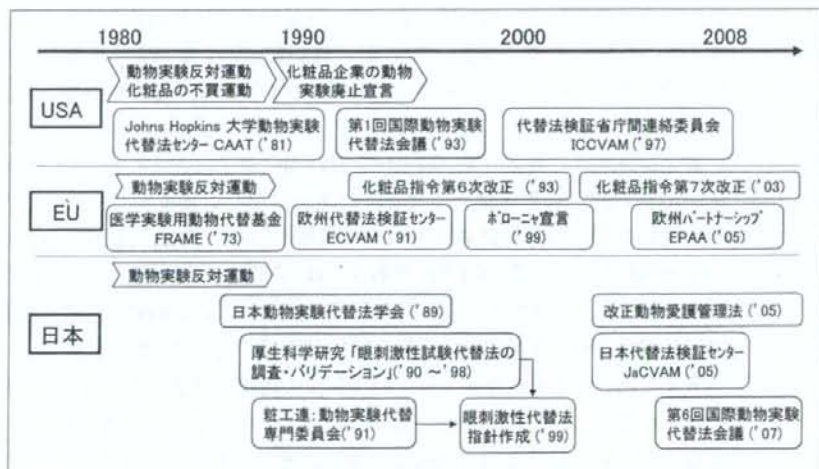


図1 代替法開発に関する歴史

や動物実験を実施した原料を配合した化粧品の販売禁止(marketing ban)等が条件つきで盛り込まれることとなった。<sup>3)</sup> 特に、2003年に公布された化粧品指令第7次改正では、2009年3月以降EU域内で動物実験を禁止することや2009年及び2013年に段階的に動物実験を実施した原料を配合した化粧品のEU域内での販売を禁止することが規定された。また、2007年に発効されたEUの化学物質の登録と規制(REACH; Registration Evaluation and Authorization of Chemicals)では、動物実験の増加を回避するための新たな方針として動物実験代替法の活用が求められている。

このような動物実験反対運動とそれに伴う法規制の動きに対し、米国では1981年に代替法研究機関としてJohns Hopkins大学の動物実験代替法センター(CAAT; Center for Alternatives to Animal Testing)、1997年にバリデーション機関として代替法検証省庁間連絡委員会(ICCVAM; Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)が設立された。EUでは、1973年に医学実験用動物代替基金(FRAME; Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments)、1991年に欧州代替法検証センター(ECVAM; European Centre for the Validation of Alternative Methods)が設立された。代替法の3Rsの原則すなわち「*in vitro*への置換(replacement)」、「動物数の削減(reduction)」、「苦痛の軽減(refinement)」はグローバル化が進み、我が国においても2005年に「動物の愛護及び管理に関する法律」が改正され、この3Rsの原則が明記された。また、2006年6月には厚生省から「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する指針」が公表された。さらに代替法の開発と評価という社会的な要請に呼応して、1989年に日本動物実験代替法学会、2005年に日本代替法検証センター(JaCVAM; Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)が設立された。

### 3 化粧品の安全性試験項目と動物実験代替法の現状

化粧品の安全性は原則としてすべての原料が安全に使用できる濃度で配合されていることがベースになる。化粧品に用いる原料の安全性評価法については、1987年6月18日付で厚生省から示された「新規原料を配合した化粧品の製造又は輸入申請に添付すべき安全性資料の範囲について(案)」に、9つの試験項目が挙げられている。これらは単回投与毒性、皮膚1次刺激性、連続皮膚刺激性、感作性、光毒性、光感作性、眼刺激性、変異原性、ヒトパッチテストであるが、化粧品の承認制度が2001年の規制緩和により大きく変更された今日では、これだけで十分であると考えべきでなく、原料のプロファイルを考慮して、更に項目を設定することも考える必要がある。

動物愛護運動の高まり並びにEU化粧品指令第7次改正の影響で、化粧品の安全性試験法を*in vitro*の試験法に置き換える代替法の開発に関心が高まっている。代替法開発は、複雑な生体反応の解析をもとに試験管レベルで生体反応の一部を再現する。*In vitro*試験法の指標が*in vivo*の毒性とどの程度の関連性があるかは、代替法の妥当性を左右する重要なポイントとなる。これまで盛んに行われてきた研究は比較的メカニズムが明確な皮膚刺激性試験、眼刺激性試験、光毒性試験、遺伝毒性試験、経皮吸収性試験等の代替法であった。

表1に化粧品の主要な安全性試験代替法の現状を示す。代替法は行政規制に採用されて利用価値が高まる。ただし、公定化までにはバリデーションや専門家による第三者評価を経なければならず、長い年月と労力を必要とする。そのため、国際標準とも言えるOECD化学物質試験法ガイドラインに記載されている化粧品関連の*in vitro*試験法は、*in vitro* 3T3NRU光毒性

*W. H. ...*

表1 化粧品品の主要な安全性試験代替法の現状

試験項目	代替法	状況	
急性毒性	動物試験の開始用量を求めるための細胞毒性試験	検証済	ICCVAMが中心になり、動物試験の開始用量を求めるための細胞毒性試験を検証した
	完全な <i>in vitro</i> 急性毒性試験	開発中	完全な <i>in vitro</i> 試験法を目標に、EUにおいてプロジェクトが進行している
皮膚1次刺激性	Episkin	公的認知	ESACは3次元皮膚モデル Episkin を承認した
	Episkin 以外の3次元培養皮膚モデル	今後、検証	Episkin 以外の3次元皮膚モデルの中にはバリデーションを実施中のもの、あるいは今後予定しているものがある
連続皮膚刺激性 感作性	なし	未着手	代替法は開発されていない
	LLNA (local lymph node assay)	国際標準化	LLNAは2002年にOECD試験法ガイドライン429に記載された。ただし、LLNAは <i>in vivo</i> 試験であり、refinementの観点での代替法である
	rLLNA (reduced local lymph node assay)	公的認知	ICCVAMとESACはREACHのための試験としてrLLNAを承認した。ただし、LLNAと同様、 <i>in vivo</i> 試験である
	h-CLAT (human cell line activation test)	今後、検証	<i>In vitro</i> 試験法であるh-CLATはバリデーション前の段階にある
光毒性	<i>In vitro</i> 3T3 neutral red uptake (NRU) 光毒性試験	国際標準化	<i>In vitro</i> 3T3 NRU 光毒性試験は2004年にOECD試験法ガイドライン432に記載された
光感作性	<i>In vitro</i> 光感作性試験	開発中	<i>In vitro</i> 光感作性試験法は基礎研究の段階にある
眼刺激性	BCOP (bovine cornea opacity permeability) 試験 及び ICE (isolated chicken eye) 試験	公的認知	ICCVAMとESACは2種の器官型培養系の試験を眼腐食性及び強度眼刺激性の評価法として承認した。ただし、化粧品の評価のためには強い刺激性の評価だけでは不十分である
	細胞毒性試験	検証済	日本において、細胞毒性試験はバリデーションを終了し、化粧品を評価するための指針(案)が公表されている
変異原性	微生物復帰突然変異試験、 <i>in vitro</i> 哺乳類染色体異常試験等	国際標準化	<i>In vitro</i> の変異原性試験がいくつかOECD試験法ガイドラインに記載されている
	<i>In vitro</i> 小核試験	今後、国際標準化	OECDは <i>in vitro</i> 小核試験のドラフトガイドラインを公表

試験のみである。2007年に皮膚刺激性試験代替法として、3次元培養皮膚モデル Episkin が ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) の承認を受けた。この方法は今後 OECD のガイドラインに記載される方向で進んでいくと推定される。他の代替法についても公的認知へ向けた取り組みの進展が期待される。この表は化粧品関連の安全性試験代替法の公的認知という視点で、多くの試験項目が残されており、今後も取り組みを継続する必要があることを示している。なお、*in vitro* 皮膚腐食性試験、*in vitro* 経皮吸収性試験等も OECD ガイドラインに記載されているが、前述の化粧品の主要な安全性試験項目に含まれていないため除外した。

#### 4 当社の動物実験代替法への取り組み

当社は、1981年より動物愛護の観点から化粧品企業としての社会的責任を考慮し、動物実験の代替法の研究を積極的に進めてきた。また、これらの研究成果については、社内における化粧品原料の評価等に活用するだけでなく、幅広く活用されるように国内外の学会等で積極的に公表してきた。これまでの当社の公表実績の中から日本動物実験代替法学会におけるゴールデンプレゼンテーション賞を受賞した演題を表2に示す。これらは、当社が様々な化粧品関連の試験法について幅広く研究し、それぞれの代替法開発に寄与してきたことを示している。特に2001年に受賞したヒト単球系細胞株 THP-1 の細胞表面分子 CD 86 を指標する方法については、その後花王株式会社との共同研究によりヒト細胞株を用いる感作性試験代替法 human



表2 当社における日本動物実験代替法学会・ゴールデンプレゼンテーション賞の受賞演題

受賞年	演題名
2003	急性毒性試験代替法の検討(1)
2002	経皮吸収予測式の開発と化粧品原料の感作性ポテンシャル予測への応用
2001	ヒト単核球細胞株 THP-1 の CD 86 及び MHC class II の発現を指標とした <i>in vitro</i> 感作性試験法の開発
1999	光細胞毒性試験における細胞種差の検討
1997	皮膚刺激性試験代替法の検討：難水溶性物質を評価する細胞毒性試験(第1報)
1996	皮膚刺激性試験代替法の検討(第2報)：炎症性サイトカインの遺伝子発現定量化
1994	化粧品原料の神経細胞に対する影響：電気生理学的手法及び MTT 法による評価
1993	接触感作性試験代替法の検討：Modified local lymph node assay (非 RI 法)
1992	赤血球及び酵母を用いる光毒性試験の検討
1991	ヘモグロビンを指標とした眼刺激性試験代替法の開発

cell line activation test (h-CLAT)として研究がブラッシュアップされ、国内外でバリデーシンの前段で行われる ring study が実施されている。<sup>4)</sup> 当社が開発した代替法の中には公的なバリデーション研究に進んだものもあり、SIRC 細胞を用いるクリスタルバイオレット染色試験<sup>5)</sup>、有精鶏卵の漿尿膜を用いるトリバンブルー染色試験<sup>6)</sup>等が眼刺激性試験代替法として評価された。厚生科学研究として行われたこの眼刺激性試験代替法のバリデーション研究の成果については、後述する。

このように当社は動物実験代替法の開発と評価に積極的に取り組んできたが、2000年代に入ると単独でさらに新しい代替法につながる基盤研究まで深く手がけることには限界が感じられた。そこで、動物実験代替法研究分野においては従来、例のなかった「コンソーシアム」型の産学連携を構築し、<sup>7)</sup> 新たな代替法の基盤研究へのアプローチを行った。資生堂動物実験代替法開発コンソーシアム (SCOT; Shiseido Consortium for *In Vitro* Toxicology) は、2003~2005年にかけて5人の社外の研究者と当社の研究者で研究を推進した。本研究の成果は日本動物実験代替法学会第19回大会において、学会との共催シンポジウム「代替法最前線：インビトロトキシコロジーのブレークスルーを目指して」において公表した。<sup>8)</sup> 細胞試験レベルにおける皮膚アレルギーの新指標の探索、皮膚における代謝を考慮した感作性試験代替法の確立の必要性、将来のリスクアセスメントでの活用を目指し物質の経皮吸収をシミュレートする *in silico* 予測モデル、経皮投与での評価を可能とする皮膚モデルを用いる遺伝毒性試験、培養細胞による急性毒性試験等の報告は、それぞれの領域の代替法開発を大いに加速したものと考えている。

当社は、動物実験代替法の開発は社会的に重要なテーマであり一企業の枠を超えて取り組むべき課題と捉えており、今後も研究成果を積極的に公表するとともに、産官学を問わず可能な限り国内外の研究機関と協力して本分野の発展に貢献していく方針である。

## 5 化粧品業界における代替法への取り組み

日本化粧品工業連合会(粧工連)では現在、化粧品及びその原料の安全性評価に関する動物実験代替法の調査、研究及び評価等を行う組織として「動物実験代替専門委員会」を設置し、活動を進めている。

日本の化粧品業界における動物実験代替法への本格的な取り組みは、1990年度に設置された厚生科学研究班の「新規原料配合化粧品の安全性評価のための試験法の研究」に粧工連が参画し、眼刺激性試験を *in vitro* 試験に代替可能か否かを検討したことに始まる。この調査、研

究が基盤となり、1991年度に発足した厚生科学研究班の「新規化粧品原料配合化粧品の安全性評価のための試験法の研究」において、眼刺激性試験代替法のバリデーション研究が実施された。参加施設は国立衛生試験所(当時)と粧工連傘下18企業にキットメーカー、大学等を加え、合計29機関であった。その結果は1999年に公表された「代替法を用いて化粧品原料の眼刺激性を評価するにあたっての指針(案)」に結びついた。この指針案では、培養細胞を用いる試験で無毒性と判断された物質は、化粧品製剤への濃度10%までの配合に対し *in vivo* で眼に対する傷害性が少ないと予測できること及びその場合に *in vivo* 試験を省略できることを示している。<sup>9)</sup>

粧工連は、新規の代替法の評価にも取り組んできた。特にOECD化学物質試験法のドラフトガイドラインのパブリックコメント募集に対しては、質問やコメントを取りまとめ国内のコーディネーターを通してOECDへ提出してきた。これまで光毒性試験代替法、皮膚腐食性試験代替法、*in vitro* 経皮吸収試験法についてガイドライン化に関わった。

近年、動物実験代替法の開発と評価に関連する欧米の動きは著しく早く、これに適切に対応していくためには欧米を中心とした国際情勢の調査は必要不可欠と考えられる。そのため粧工連では、これらの調査を継続的に進めている。

2007年には代替法の更なる利用を目指し、厚生労働科学研究のなかで「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討委員会」が発足した。医薬部外品、特に薬用化粧品の製造販売承認のための安全性評価では現在、動物実験が求められており、それを代替法で行うことができるか否かについて、粧工連や関係機関の協力のもと検討されている。

## 6 国際的な代替法への取り組み

近年、代替法の開発と評価はグローバル化が加速し、代替法センター相互の協力体制も拡充されつつある。2005年11月に発足した我が国のJaCVAMはその役割の明確化、国内外の学会及び関係機関との調整、国際協調へ向けた取り組みを着実に進めている。2007年に東京で開催された第6回国際動物実験代替法会議では3Rsのアジアへの普及が加速されるとともにJaCVAMの存在がグローバルに認識された。

化粧品業界における取り組みとしては、欧州化粧品工業連合会(COLIPA)が動物試験代替法の開発と受け入れに向けた活動に積極的であり、コーディネートを目的とする常設の委員会を設置している。また、米国では化粧品の業界団体であるPersonal Care Products Council(PCPC)が、2007年に動物実験代替法を盛り込んだ改訂版安全性評価ガイドラインを発行する等の活動を進めている。さらに、日米欧にカナダを加えた4極における化粧品規制協力国際会議(ICCR)では代替試験のデザインや、実施、評価についての協力が検討課題になっている。

代替法の開発における国際協調についてみると、試験法の利用方法や各国の法規の違い等からしばしば難しい課題が生じている。例えば、皮膚や眼に対する刺激性の評価では化学品の注意表示を目的とするのか、化粧品等へ配合する原料の選別及び保証を目的とするのかで考え方が大きく異なる。一方の目的で開発された代替法が、別の目的で使用できるとは限らない。さらに同じ目的で開発されたとしても、ある範囲で用いられた基準が他の範囲でも通用するとは限らない。これらをいかにして調整していくかが課題となる。一方、バリデーション研究における国際協調は、過去に数々のバリデーションの経験を積み重ねた方法論が洗練されてきており、今後より効率的に進められると考えられる。

7 おわりに

当社は動物実験代替法の開発に対する社会的要請に対応し、自社開発、共同開発から「コンソーシアム」型の開発までも手がけてきたが、1社での開発は既に限界がきている。基礎研究を行い、それを代替法に結びつけていくためにはECVAMやCOLIPAのように、代替試験の項目毎に目標を共有化できる多機関によるプロジェクトを推進する体制が必要であろう。試験法の妥当性を検証するバリデーション研究は代替法を公的認知させていくうえで重要な過程である。しかし、そこだけに力点をおいていたのでは将来はない。代替法開発においてブレークスルーを果たすのは基礎研究であり、バリデーション研究にも増して重要な課題であるという認識をもって取り組む必要がある。EUでは「European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing (EPAA)」として、代替法開発をライフサイエンス研究全体に関わる問題として捉えて産官学での対応を開始しており、当社も参画している。我が国においても、代替法開発をライフサイエンス研究全体に関わる責任の一環として社会的にサポートするシステムを整備していく必要があると考える。

参考文献

- 1) デヴィッド・ドゥグラツィア, "1冊でわかる動物の権利," 戸田清訳・解説, 岩波書店, 東京, 2003.
- 2) The three Rs declaration of Bologna, *Altern. Lab. Anim.*, 28, 1(2000).
- 3) 豊田英一, フレグランスジャーナル, 2005, 2月号, 15.
- 4) Ashikaga T. *et al.*, *Toxicology in Vitro*, 20, 767-773(2006).
- 5) Itagaki H. *et al.*, *Toxicology in Vitro*, 5, 139-143(1991).
- 6) Hagino S. *et al.*, *Toxicology in Vitro*, 5, 301-304(1991).
- 7) 石館周三, フレグランスジャーナル, 2004, 1月号, 43.
- 8) 第19回日本動物実験代替法学会, 伊勢原, 2005 講演要旨集.
- 9) Ohno Y., *Altern. Lab. Anim.*, 32, Suppl. 1, 643(2004).

新刊紹介

Book Review

近代医薬品の変遷史  
薬効・系統・年次別

深井 三郎 著

新生出版/A5・358頁・3,800円

何気なく飲んでいる薬も、「それはいつ販売されたのだろう」、「同効他剤にはどのようなものがあるのだろう」、また「あの薬はいつ市場から撤退したのだろうか」など、ふと思ふことがある。本書は、そのような疑問に答えてくれる。著者は、先に出版した20世紀から21世紀にかけての医薬品の歩みを集大成させた「日本の新薬変遷史 CD-ROM」の

ダイジェスト版として本書を発行したもので、医薬品の変遷が一目で分かる。

内容は、医薬品の薬効分類に従い、中枢神経用薬、感覚器官用薬、循環器官用薬、呼吸器官用薬、消化器官用薬、その他の代謝性医薬品、腫瘍用薬、アレルギー用薬、抗生物質製剤、化学療法剤、生物学的製剤が取り上げられている。消化器官用薬を例にとると、消化性潰瘍剤及びその他の消化器官用薬に大別している。前者においては、薬物療法の歴史の概説から始まり、各論においては、攻撃因子抑制剤の歴史について、1956年のコランチル錠に始まり、1982年のH2受容体拮抗薬、1991年からプロトンポンプ阻害剤の歴

史が記載されている。引き続き、防御因子強化剤についても各種薬剤が作用系統別に記載されている。年表形式で、薬剤名と剤型、効果・効能、薬剤の特徴などが分かりやすく書かれている。詳細に調査され、まとめられた著者に敬意を払わずにはられない。

薬学部生には医薬品開発の歴史のみならず、薬の特徴や作用機序などを知ることができる内容になっており、お薦めの1冊である。

山田久陽 Hisaharu YAMADA

※本書は、日本薬学会「薬学情報コーナー」で閲覧できます。

## 総論

# 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ブ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（ブリックテスト、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ブリックテストから開始しても問題はない。

#### ③ ブリックテスト/スクラッチテストの準備と手技

##### 1) ブリックテスト

##### 1. 必要な器具の準備（図4）

ブリックランセット（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）、ブ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

##### ◆ 通常のブ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3 cm以上離して置き、肘から3 cm、手首から5 cm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、サクランボなど）

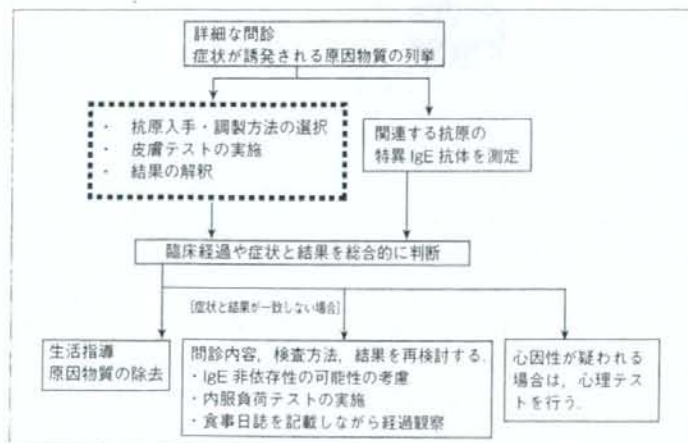


表1 即時型アレルギー診断のフローチャート

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（シラカンパ、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： シラカンパ、ブタクサ、ヨモギなど  
花粉症

薬剤アレルギー： 被疑薬および類似する薬剤

アトピー性皮膚炎： ダニ、真菌など

図2 ブリックテストの抗原準備



図4 ブ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ギーを塗布する。  
・アナフィラキシーが誘発された患者に対して行うが、  
通常はブリックテストから開始する。

②ブリックテスト  
・点状の傷をつけアレルギーを浸透させる。

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ギーを浸透させる。  
・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  
・アレルギー液 0.02 ml を前腕屈側の皮内に注射する。  
・アレルギーの調整や安全性の確保がむずかしい。

⑤内服負荷テスト  
・アレルギー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、負荷するアレルギー量が増え、アナフィラキシーを誘発する危険性が高まる。

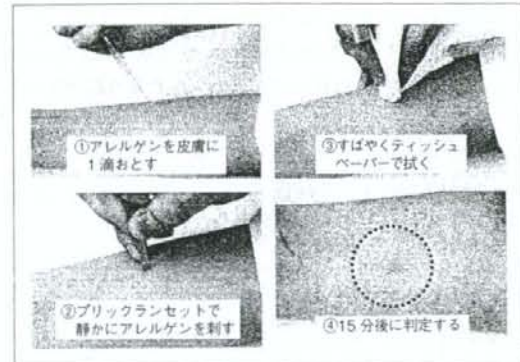


図5 ブリックテストの手技

や野菜に直接ブ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. ブ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）

ブリックテストが陰性の場合にはスクラッチテストにす

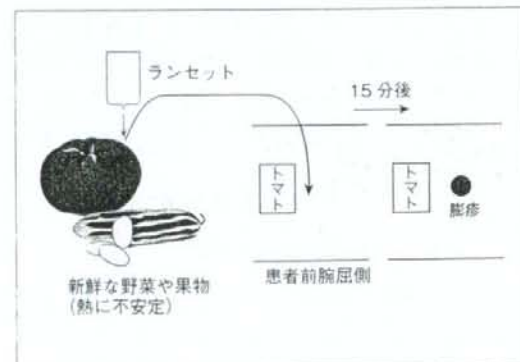


図6 Prick to prick test

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、ブ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。判定はブリックテストと同様である。


## 総論

### 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	(-)

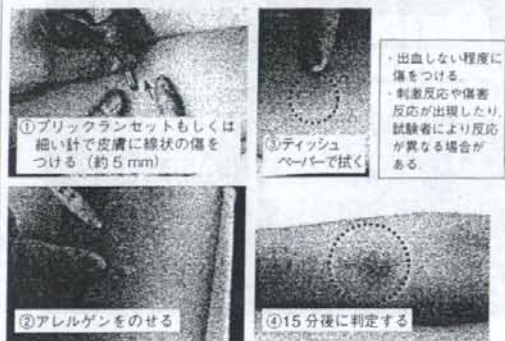
15分後に膨疹の直径mm(最長径とその中点に垂直な径の平均値)を測定し、紅斑は判定対象としていない。

判定結果が2+以上を陽性としている。



対照液が入らぬ場合は、3mm以上の反応を陽性と判定してもよい。  
Dinborg, S. et al. Allergy 47: 48, 1992

図7 ブリックテストの判定



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アレルギーをのせる

③ティッシュペーパーで拭く

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

#### 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、アレルギー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にブ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。

- 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種別系列をつくること
- 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を。
- 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内注射や点滴を行えるように常備しておく。

図9 ブリックテストのこつ

- 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。

・金属アレルギー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。

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



図 11 パッチテストの抗原準備

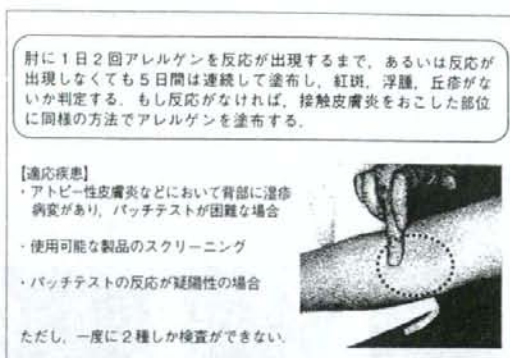


図 13 その他のパッチテスト：ROAT (Repeated open application test)



図 12 その他のパッチテスト：オープンテスト

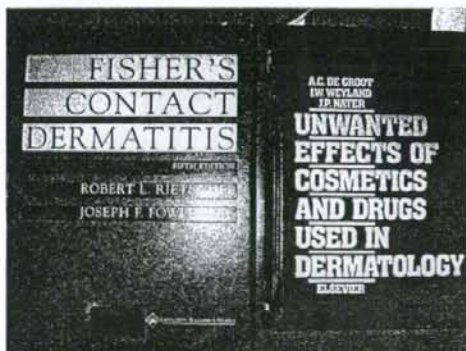


図 14 参考図書例 (左: Fisher's Contact Dermatitis 5th ed, Lippincott Williams & Wilkins, 右: Unwanted Effects of Cosmetics and Drugs used in Dermatology, Elsevier Science)

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) により適切な稀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 各抗原の稀釈と貼付方法

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 にアレルギーを載せる。

② シャンプー、石鹸、洗剤など水溶性の  
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。

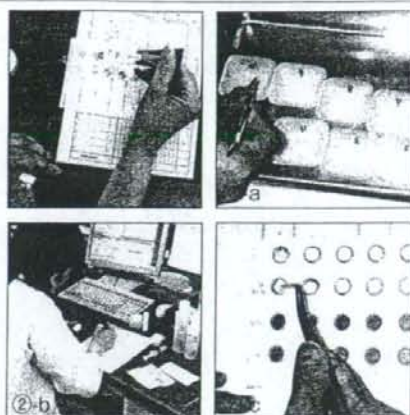


図 15 持参品のパッチテスト方法

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、茎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。

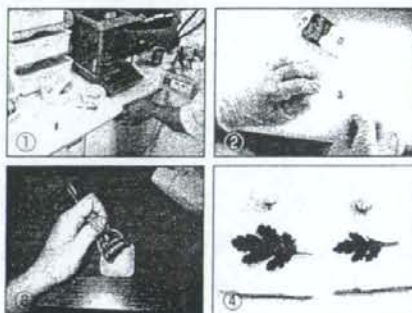


図 16 その他持参品の稀釈方法及び貼付方法

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  
判断してはいけない。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。

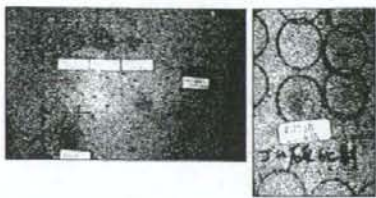
#### ⑨ 患者への説明

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 バッチテストの判定基準



図 18 (左) アレルゲン説明カード、(右) 持参品結果一覧

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。

**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 豊明市番町田楽ヶ窪 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ギー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 6J/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。

**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ギーと考えた。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、原因アレルギーであるか否かは不明である。

スクリーニングパッチテスト陽性所見 (72時間判定)  
3種類の口紅 (口紅 A, B, C), およびエステルガム 2%pet. が陽性であった。

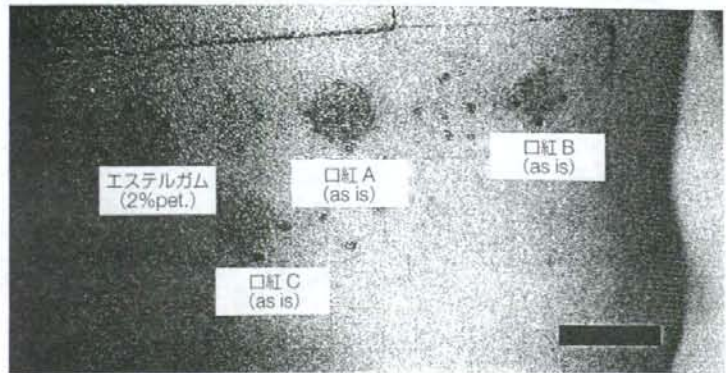


表1 スクリーニングパッチテスト結果

試料	濃度 / 基剤	48時間	72時間	1週間
口紅 A	as is	+?	++	++
口紅 B	as is	-	+	+
口紅 C	as is	-	+	+
エステルガム	2%pet.	+?	+	+

(ICDRG 基準)

口紅 A, B の成分パッチテスト陽性所見 (1週間判定)  
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 (1%pet.) が陽性であった。



表2 成分パッチテスト結果

試料	濃度 / 基剤	48時間	72時間	1週間
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	1%pet.	-	+	++
口紅 A・B	//	0.1%pet.	-	+
そのほかの成分		-	-	-
リンゴ酸ジイソステアリル	30%pet.	-	+	++
口紅 C	そのほかの成分	-	-	-

(ICDRG 基準)

## case 15 口紅



軽快時の臨床所見  
軽度の色素斑を残し、症状は軽快している。

## 生活指導

口紅の主な成分は油性基剤、着色料、香料、酸化防止剤である。油性基剤として、ヒマシ油が汎用されていたが、ヒマシ油に含まれるリシノール酸が感作性を有することが報告された<sup>2)</sup>。そこで、ヒマシ油の代替原料として、合成分岐脂肪酸エステルが使用されるようになった<sup>2)</sup>。

リンゴ酸ジイソステアリルは、イソステアリアルコールとリンゴ酸のジエステルであり、口紅のようなスティック状製品、ファンデーション、クリームなどに使用される<sup>3)</sup>。これまでに、口紅、リップクリームなどに含まれたリンゴ酸ジイソステアリルによる接触皮膚炎が報告されている<sup>4)</sup>。

エステルガムは、主にアビエチン酸のトリグリセリドで構成される<sup>5)</sup>。膜の耐水性を強化するために、ニスやラッカーなどに配合され、また、チューインガムの基剤として用いられている<sup>5)</sup>。口紅にはつやだし成分として配合されており<sup>6)</sup>。これまでに、口紅<sup>6)</sup>、ファンデーション、ブラスター剤、絆創膏などに含まれるエステルガムによる接触皮膚炎が報告されている<sup>7)</sup>。

本症例は、ステロイド外用薬にて加療後、リンゴ酸ジイソステアリル、エステルガムを含まない口紅の使用を指導したところ、軽度の色素斑を残し症状は軽快し、再発を認めていない。

2001年から日本では、化粧品は全成分表示になっているため<sup>8)</sup>。原因アレルゲンを確定できた場合は、成分表示を確認し、化粧品を選択することが可能である。代替品を安全に選択するために、成分パッチテストは有用であると考えた。

本例は第25回日本接触皮膚炎学会総会・学術大会(2000年、名古屋市)において報告した。

## 文献

- 1) De Groot AC: Patch testing: Test concentrations and vehicles for 3700 chemicals, 2<sup>nd</sup> ed., Elsevier Science, Netherlands, 1994
- 2) 関永博人ほか: 香粧誌 16: 1, 1992
- 3) 光井武夫ほか: 新化粧品学 第2版, 南山堂, 東京, p.144, 2001
- 4) Sugiura M et al: Environ Dermatol 8: 6, 2001
- 5) (財)日本公定書協会編: 化粧品原料基準 第2版 注解I, 薬事日報社, 東京, p.123, 1984
- 6) 荻野素子ほか: 皮膚 31 (増6): 180, 1989
- 7) 日本接触皮膚炎学会研究班: 皮膚 33 (増11): 177, 1991
- 8) 光井武夫ほか: 新化粧品学 第2版, 南山堂, 東京, p.331, 2001

## Key words

口紅, リンゴ酸ジイソステアリル, エステルガム

## 曾和 順子 Sowa, Junko

大阪市立大学大学院医学研究科皮膚病態学  
〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3  
E-mail: jsowa@med.osaka-cu.ac.jp

## 鈴木 加余子 Suzuki, Kayoko

刈谷豊田総合病院皮膚科  
〒448-8505 刈谷市住吉町5-15

## 鷺見 康子 Washimi, Yasuko

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

## 松永 佳世子 Matsunaga, Kayoko

藤田保健衛生大学医学部皮膚科