

## 6) 感作性試験

手島玲子

国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部

感作性試験は、生体の細胞性あるいは、体液性免疫機構の活性化に伴う過敏症反応を調べることが目的となるが、現在、感作性試験の国際的ガイドラインとしては、OECD毒性試験ガイドライン406“皮膚感作性試験”が設定されているのみである。スライド1に、感作性試験並びに抗原性試験のOECD並びに国内での動向について示す。

スライド1に示したように、皮膚感作性試験に関しては、OECD毒性試験ガイドライン406がある。ここには、1992年に改正された新ガイドラインについて記しているが、モルモットを用いる Guinea Pig Maximization Test (GPMT)<sup>1)</sup> および Buehler Test<sup>2)</sup> の2つが推奨されている。また、マウスを用いる Mouse Ear Swelling Test (MEST)<sup>3)</sup> および Local Lymph Node Assay (LLNA)<sup>4)</sup> を皮膚感作性物質の一次スクリーニング法と

して使用することが認められている。この場合、陽性物質に関しては、皮膚感作性があるという結論になり、さらに、陰性物質に関しては、モルモットに関する試験を行い、皮膚感作性の有無を確認することが求められている。具体的な試験法に関しては、後程資生堂の畑尾先生に、詳細な報告を願ひ、私の方は詳細は省かせて頂く。国内においても、皮膚外用剤に限って、皮膚感作性試験のガイドラインがすでに通知されており(平成元年薬審1第24号)、医療用具に関しては、平成7年に「医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン」が作成され、その中で、GPMTまたは Adjuvant Patch Testを使用する感作性試験が設定されている。また、食品添加物に関しては、平成8年「食品添加物の指定および使用基準改正に関する指針」が作成された。その中に設定された「抗原性試験」で、新

スライド1：感作性試験並びに抗原性試験のOECD並びに国内での動向

- ・皮膚感作性試験
  - OECD毒性試験ガイドライン406(1992)
  - ”Skin sensitization(皮膚感作試験)”
  - モルモット--Maximization Test (GPMT)
  - Buehler Test
  - マウス--Mouse Ear Swelling Test (MEST)
  - Local Lymph Node Assay (LLNA)
- ・抗原性試験(即時型のアレルギー性試験)
- OECDガイドラインはなし

・国内での動向

	一般医薬品	皮膚外用剤	農薬	一般化学物質	食品添加物	医療用具
感作性試験		○ (H1)	○ (S60)		○ (H8)	○ (H7)
抗原性試験	○				○ (H8)	

## スライド 2 :

- ・抗原性試験
  - (1)全身性反応
    - モルモット全身性アナフィラキシー反応(ASA)
    - モルモット受動皮膚アナフィラキシー反応(PCA)
    - マウス IgE 抗体のラット受動皮膚アナフィラキシー反応(PCA)
  - (2)局所リンパ節試験
    - マウスまたはラットの膝窩リンパ節(PLNA)を使用：  
ヨーロッパ、米国で実施
- ・偽アレルギー反応試験
  - マスト細胞に対する直接的な活性化を検討
    - 培養マスト細胞を用いる in vitro 試験

## スライド 3 : PLNA 試験のまとめ

### Popliteal lymph Node Assay (PLNA)

#### Direct PLNA - summary -

- ・ Cheap
- ・ Simple
- ・ Rapid
- ・ Indicates immunostimulating capacity
- ・ Can be used to grade immunostimulating potential of related compounds

#### Pitfalls

- ・ Immunoactive metabolites
- ・ Primary irritants

#### Limitations

- ・ Does not prove T cell involvement
- ・ Specificity of response unknown → possibilities for mechanistic studies limited

たな食品添加物の指定にあたって、適切な即時型及び遅延型アレルギー試験を実施することが要求されることとなった。また、農薬に関しては、昭和60年「農薬の安全性評価に関する基準」の中で、旧OECDガイドラインに則った皮膚感作性試験を求めている。

以上、皮膚感作性試験に関するガイドラインはOECD新旧ガイドラインに準じた形で採用されており、モルモットを用いるものが多くなっており、多くは細胞性免疫を主体とするIV型、すなわち遅延型アレルギー反応によるものである。一方、レアギン抗体の関与するI型(即時型)アレルギーによるいわゆる抗原性試験の公的ガイドラインとしては、OECDのガイドラインはなく、国内での食品添加物に関する指針に限られているのが現状である。新医薬品の抗原性試

験(即時型アレルギー)については、現在検討中であり、case-by-caseでの実施となっている。以下、この抗原試験の現状および問題点等について詳しく述べる。スライド2に、現在試みられている抗原性試験の概要を示す。国内では、モルモットにおける能動的全身性アナフィラキシー(ASA)試験並びに受動的皮膚アナフィラキシー(PCA)試験、マウスIgE抗体のラット受動皮膚アナフィラキシー試験が多用されているのが現状であるが、モルモットを用いる即時型アレルギーに関する抗原性試験は、高分子化合物に比べ、ヒトにおける低分子化合物のアレルゲン性の予知能力が弱いとされており<sup>5)</sup>、感作抗原として薬物-蛋白結合物を用いた場合の結合物作成方法についても検討を要する点が多いという指摘がされている<sup>6, 7)</sup>。現在、モルモットを用いる方法

## スライド4：異なった種類のマスト細胞の性質及びラットがん化好塩基球(RBL)の性質

Characteristics of different populations of rat mast cells

Property	CTMC	MMC	BMMC	RBL-2H3 cell
Histochemistry	safranin+	safranin-	safranin-	safranin-
T-cell factor dependence	No	Yes	Yes	No(tumor cell)
Secretory granule electron density	+++++	+++++	++	+
Major proteoglycan	heparin	ChS-diB	ChS-diB	ChS-diB
Serine protease	RMCP-I	RMCP-II	RMCP-II	RMCP-II
Histamine( $\mu\text{g}/10^6$ cells)	10~30	0.1~1	1~2	~0.1
IgE receptor	Yes	Yes	Yes	Yes
Arachidonic acid metabolite	PGD2	LTC4>PGD2	LTC4=PGD2	LTC4>PGD2
Activation by 48/80	Yes	No	No	No

CTMC:connective tissue mast cells, MMC:mucosal mast cells, BMMC:bone-marrow derived mast cells  
RBL-2H3:secreting subline of rat basophilic leukemia cells

に加え、EUでは、医薬品の抗原性の検討に、Mouse Popliteal Lymph Node Assay (PLNA) が広く使用されている<sup>8)</sup>。

まず、このPLNA試験の概要の紹介並びに問題点の提起を行う。PLNAは、もともとは、薬物や化学物質の自己免疫疾患誘発能を調べる方法として提案されていたが、OECD皮膚感作性試験の一次スクリーニングとして用いられるLLNAと同様、リンパ節リンパ球の増殖を指標に、免疫初期のリンパ球の活性化を調べ感作誘導反応を調べる方法で、感作原性の予測の可能性も検討されている方法である(スライド3)。具体的には、ラットまたは、マウスのfoodpadに化合物をadjuvantなしに皮下投与し、7日後に、膝窩リンパ節を取り出し、リンパ節重量並びに細胞数の測定を行い、フローサイトメータ等で、リンパ球サブセットの割合を調べる手法をとっている。

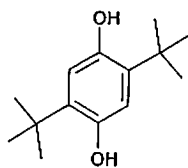
リンパ球の増殖を縦軸に、横軸に感作をしてからの時間をプロットしてみると、多くの化合物で、6-8日をピークにした増殖反応が見られるが、坑うつ薬Zimeldineのように、効果の持続傾向の見られるもの(10-15日をピークとするもの)、および、silicaのように、この場合は、false negativeということになるが、刺激性があるがゆえに増殖性を示すものがある。この方法を用いて、1996年スイスで行われたDIA(the Drug Information Association)主催の医薬品の免疫毒性試験に関するワークショップの中で、オランダUtrecht大学Alberts博士らは、60以上の化合物を調べた結果から、ヒトでアレ

ルゲン性を有していた化合物の大部分が陽性で、一方、ヒトでアレルゲン性を有していない化合物の大部分が陰性であり、低分子化合物においても、ヒトの結果とよい相関が得られたと報告している。ただし、procainamide, propyl thiouracil の様なP-450で代謝を受けて作用する薬物は偽陰性となること、また、アセトン、エタノールなど、刺激性の溶媒で偽陽性とする例のあることも報告されている。スライド3にPLNA試験のまとめを示すが、刺激性の反応との区別をする必要、S-9 mixの併用等の問題があるが、抗体の産生を検出する方法の開発<sup>9)</sup>、MHC Class II抗原の発現の有無の確認、サイトカインの産生の有無の確認等の手法をさらに導入することにより、免疫学的により特異性の高い方法になると思われ、本方法は、簡便さの点からも、低分子化合物の抗原性の予知をするための有用な方法の一つとなりうるものと思われる。

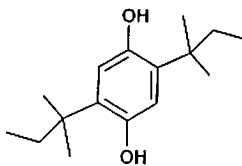
次に、薬物のもつ偽アレルギー反応を検出する方法について述べる。スライド2に示すが、薬物の中には、IgE抗体は産生されないが、マスト細胞などへの直接的作用の結果、ヒスタミンやロイコトリエンなどの化学伝達物質の遊離の増加がもたらされ、アレルギー様の反応(偽アレルギー)が惹起されることがある。従って、化学物質のもつ偽アレルギー作用を、予測できる手法もまた重要と考える。手法としては、マスト細胞からのヒスタミン遊離を*in vitro*で測定する方法が考えられる<sup>10)</sup>。

スライド4に示すが、ラットマスト細胞

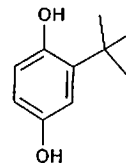
スライド 5 :



2,5-Di(*tert*-butyl)-  
1,4-hydroquinone  
(DTBHQ)



2,5-Di(*tert*-amyl)-  
1,4-hydroquinone  
(DTAHQ)



2-*tert*-butyl-  
1,4-hydroquinone  
(MTBHQ)

### Methods

Cell: RBL-2H3 cells (FcεRI+)

Stimulation: antigen (DNP<sub>7</sub>-BSA) or  
12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) (protein kinase C activator)

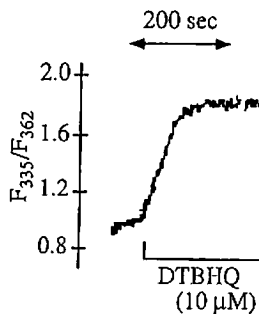
Functional Analysis:

- Ca<sup>2+</sup> signals— examining the change of fluorescence intensity of fura-2-loaded cells (Ex at 335 nm and 362 nm, Em at 495 nm)
- degranulation— determined by measuring the activity of β-hexosaminidase
- Release of LTC<sub>4</sub> and TNF-α ---- quantified by enzyme immunoassay

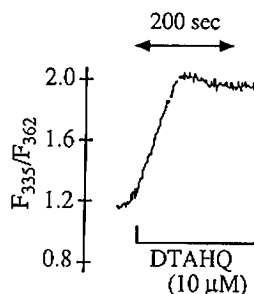
スライド 6 :

### The Effects of Three Compounds on Intracellular Free Ca<sup>2+</sup> Concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) in Fura-2-loaded RBL-2H3 Cells

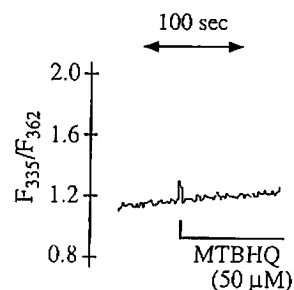
a. DTBHQ



b. DTAHQ



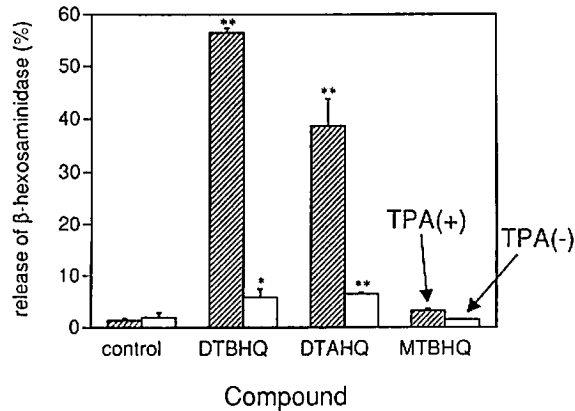
c. MTBHQ



RBL-2H3 cells ( $6 \times 10^5$  cells/ml) were loaded with Fura-2 AM (6 μM), and illuminated alternately at two excitation wave length (335 and 362 nm) with stirring at 37°C. Fluorescence at 495 nm was measured, and the ratio of the fluorescence strength obtained at these two wave length was calculated and used as an indication of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

スライド 7 :

### Effects of Three Antioxidants with TPA on $\beta$ -Hexosaminidase Release from RBL-2H3 Cells



The cells were incubated with each compound (10  $\mu$ M) for 30 min with TPA or buffer, and the activity of  $\beta$ -hexosaminidase released was determined. The total (released and residual) amounts of  $\beta$ -hexosaminidase were taken as 100%. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. (n = 2-6). Significantly different from the control at \*P<0.05 and \*\*P<0.01 (by Student's t test). TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate, a protein kinase C activator.

は、ヒスタミン含量及び compound 40/80 に対する応答性等により、主に粘膜型(MMC)及び結合組織型(CTMC)の2つのグループに分けられる。私共は、MMCと性質の類似する、ラットがん化好塩基球(RBL-2H3)細胞を用い、細胞からのヒスタミン遊離を測定する方法を検討している。マスト細胞に直接作用する物質の例として、次のスライド5に示す数種の抗酸化剤を用いた研究を行った例を示す。

ここに示す細胞内カルシウム濃度上昇を起こす2種の化合物(DTBHQ及びDTAHQ)及び、細胞内カルシウム濃度上昇を起こさない化合物MTBHQにつき、細胞からのヒスタミン遊離及び他のメディエータ遊離について検討を行った。

その結果をスライド6-8に示すが、細胞内カルシウム濃度上昇とヒスタミン遊離作用並びにサイトカインであるTNF- $\alpha$ 産生により相関のあることを見いだした。ただし、これらカルシウム濃度上昇を起こす化合物の場合、単独での遊離作用は弱く、TPA(phorbol ester)存在下で、相乗的に遊離作用を起こすものであった。この研究は、

化合物のもつ偽アレルギー作用を考える上で、培養マスト細胞からのヒスタミン遊離を調べることで、さらには、カルシウム濃度上昇等情報伝達系への影響を調べることで、化合物の細胞への作用部位を知るうえで有用であることを示すものであると考えている。

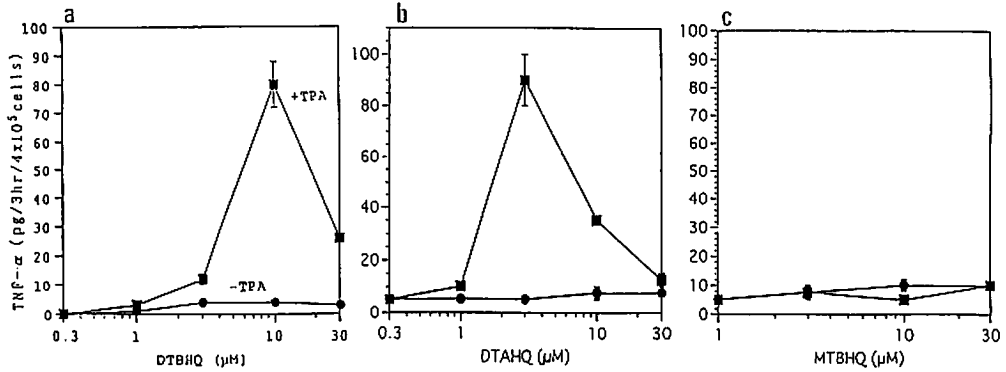
以上、感作性試験の中でも偽アレルギー反応も含め、I型(即時型)アレルギーの関与の考えられる抗原性試験について主に述べてきたが、感作成立を*in vitro*で代替する方法についてはまだ提唱されておらず、今後とも、検出方法の改良ばかりでなく、*in vitro*代替法をめざしたさらなる手法の改良が進んでいくものと思われる。

#### 文献

- 1) Magnusson, B., and Klingman, A. M. (1969) J. Invest. Dermatol. 52, 268.
- 2) Buehler, E. U. (1965) Arch. Dermatol., 91, 171.
- 3) God, S. C., et al. (1986) Toxicol. Appl. Pharmacol., 84, 93.
- 4) Kimber I. et al. (1986) Food Chem. Toxicol., 24, 585.
- 5) 牧栄二ら (1997) 第4回免疫毒性研究会講演要旨集

スライド 8 :

Effect of three hydroquinon-antioxidants



Dose responses for TNF-α release from RBL-2H3 cells induced by DTAHQ, DTBHQ, and MTBHQ in the presence or absence of TPA were examined.

18.

- 6) Park, B. K. (1987) *Biochem. Pharmacol.*, 36, 581.
- 7) 化学物質のリスクアセスメント—現状と問題点— (1997)191, 薬業時報社.
- 8) Bloksma, N., et al. (1995) *Crit. Rev. Toxicol.*, 25, 369.
- 9) Albers, R., et al. (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 143, 102
- 10) Akasaka, R., et al. (1996) *Biochem. Pharmacol.*, 51, 1513

質問事項

1. RBL-2H3細胞を用いた仕事で、細胞内カルシウム濃度上昇を測定することは、化学物質の持つ偽アレルギー活性を知る指標にな

るかどうか

答:細胞内カルシウム濃度上昇は、細胞からのヒスタミン等のメディエータ遊離にとって必要とされる条件である。ただし、今回示した例のように、カルシウム濃度上昇だけでは、脱顆粒反応が、十分いかず、他のファクターが必要な例もある。従って、細胞にとってカルシウム濃度上昇は、その活性化のために十分条件ではないが、必要とされる条件の一つであるため、活性化の指標としては、重要なものであると思われる。