

7) 感作性試験

畑尾正人

資生堂 安全性・分析センター

1. 感作性のメカニズムと感作性試験代替法

接触感作性は経皮的に摂取されたハプテンが体内のキャリアー蛋白と結合して感作原となり、感作性を発現すると考えられている。通常、この感作原は皮膚に存在するランゲルハンス細胞に取り込まれ、これにより活性化したランゲルハンス細胞が局所リンパ節に遊走し、Tリンパ球に抗原提示を行う。この抗原提示を受けたTリンパ球が活性化し、その特異的な抗原を認識するTリンパ球の増殖、体内への拡散までを感作誘導期と考える (Fig.1)。感作誘導が成立した個体に、再度、感作原が作用すると局所で炎症などの組織傷害反応が起こる。こ

の過程が感作誘発期である。

このように感作性は単純な局所反応ではなく、全身の免疫系が関与する多段階の複雑な反応であることが、動物実験代替法的な観点から考えたreplacementの系を構築することを困難にしている。つまり、この多段階の反応のそれぞれを評価する単純系のreplacementが用意されなければ完全な感作性試験の代替法は確立できないわけであるが、生体の免疫応答の機構が解明されていない部分も多く、現在までのところ一部の段階の *in vitro* の評価法が提案されているが、確立には至っていない (1)。

2. 感作性の評価系

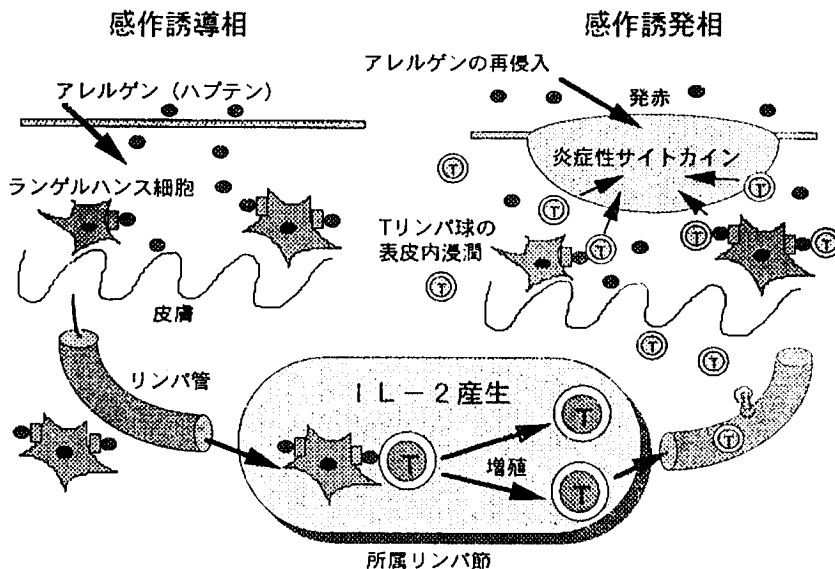


Figure 1. 接触過敏症 (遅延型アレルギー) の発症機序

現在、感作性の評価系として汎用されているものは基本的に動物実験を用いたものが多くを占めるが、動物を使わない方法としていくつかの方法が評価されている。いずれの方法も単独では完全なものではないが、その特性を組み合わせれば、ある程度、動物実験の削減に寄与できる可能性があると考えられる。

(1) 動物を用いない評価法

初めに、代替法のreplacementの考え方から、感作性の評価系として動物を使用しない評価法について述べる。動物を使わないで感作性を完全に予測する方法が現時点では確立されていないため、以下に挙げた評価法には質的に異なる方法が混在している。構造活性相関を用いた方法およびhuman repeated insult patch testはすでに使われている方法であり、限定された目的に対しては有効な手段と考えられている。一方、蛋白結合性試験、ヒト末梢血由来樹状細胞による方法はreplacementの考え方に基づいた*in vitro*試験法であるが、研究段階にあると考えられる。また、これらと組み合わせるために、他の機構を反映した*in vitro*試験法も検討される必要があるだろう。

・構造活性相関による評価法：

実際の試験を行わずに化学物質のアレルギー性を予測する方法として、構造活性相関により化学物質の感作性を評価する方法が提案されている。こうしたアプローチは感作性試験に限らないが、近年、商業的なデータベースが整備されたことにより(DEREK(2)、TOPKAT(3))、試験機関自身がデータベースを構築しなくても、構造活性相関による評価が可能になってきた。しかし、この方法を用いるには対象となる物質の構造が既知であることが必要条件である。従って、構造が未知であったり、過去に調べられたことのない新たなタイプの被験物質に対しては使うことが出来ない。また、評価の対象となる物質が天然抽出物のような多種の微量化学物質の混合物である場合や試料に含まれる少量の不純物が感作性の原因物質である場合にはその被験物質の感作性を見落としてしまう可能性もある。つまり、この方法は潜在的な感作性の可能

性をスクリーニングするためには有効であるが、最終的なリスクアセスメントとしては十分とはいえない。

・蛋白結合性試験：

接触感作性はアレルギーを起こす物質が経皮吸収される必要があるため、吸収性の高い低分子化合物のハプテンにより引き起こされることが多い。ハプテンが感作性を発現するためには蛋白に結合する必要があるが、こうしたハプテンが結合した蛋白は分子量が変化したり、その電気的性質が変化することが考えられることから、電気泳動などによりこうした変化を捕らえることにより、低分子物質の感作性を予測するものである(4)。この方法は実験系的に容易であり、特殊な測定機器等の必要がないことから、汎用性が高いが、電気泳動の結果の判定基準に定量性がないこと、また蛋白結合性はハプテンがアレルギー性を示すことには必要条件ではあるかもしれないが、十分条件ではないため、他の方法と組み合わせることが必須である。

・ヒト末梢血単球由来樹状細胞：

近年の免疫学的な基礎研究から、末梢血由来の単球にGM-CSFおよびIL-4を添加して培養することにより、抗原提示機能を有する樹状細胞を誘導することが可能となった。この細胞はその表現型から皮膚にある抗原提示細胞のランゲルハンス細胞様の性質を持つことが明らかとなってきたため、感作性試験への応用についても検討された。以前のマウスを用いた研究から、感作性物質を投与した場合にランゲルハンス細胞はIL-1 β のmRNAを発現することが知られている。このヒト末梢血単球由来樹状細胞においても培養系で同様な挙動を示すことが報告され、感作性試験の一部に応用できる可能性が示された(5)。しかし、この方法はヒト細胞を使うためデータを外挿する必要はないが、ヒトの個体差の問題や更なる機構的な解析およびより多くの被験物質による応答等について検討する必要がある。また、この方法論が確立されたとしても、多段階の感作反応の一部の再現でしかないので、他の段階を評価できる実験系と組み合わせる感作性試験を構築する必要があると

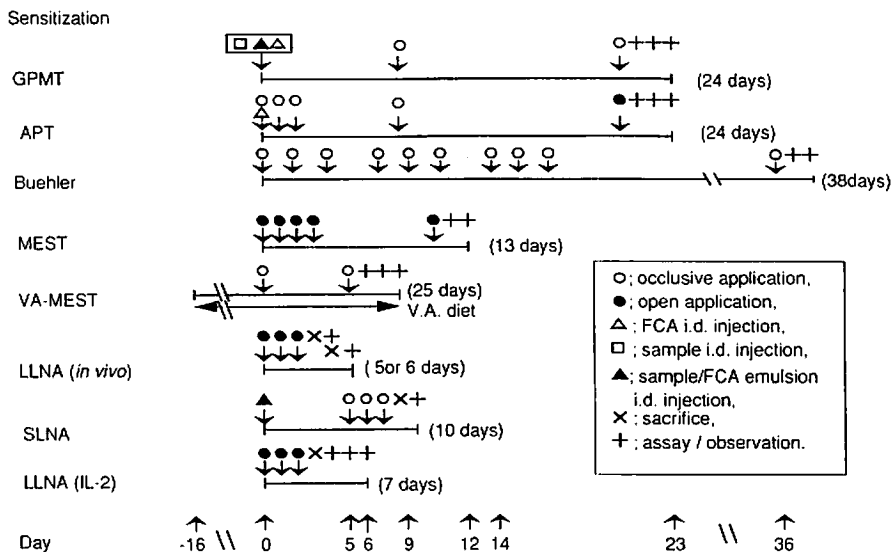


Figure 2. 一般的に用いられている感作性試験法

考えられる。

・ Human Repeated Insult Patch Test :

この方法はヒトに対して連用試験を行い、その被験物質が引き起こす皮膚刺激性、皮膚感作性について最終的に評価するものである(6)。そのため、動物による試験法と異なり、ヒトへの外挿をする必要はないが、被験物質の安全性については十分確認した後でなければ試験を開始するべきではない。また、被験者により特定の化学物質に対する感作性に感受性の差があることから、被験者の選択も重要な因子となる。この方法は対象となる被験物質の感作性がないことを確認する方法であり、適用前に必ず他の方法を組み合わせることなしには感作性評価として成立しないと考えられる。

(2) 動物を用いる試験法

一般的に用いられている動物を用いた感作性試験法についてFig.2にまとめた。このうち、OECDガイドラインの中で、モルモットを用いた皮膚感作性試験の例として挙げられているものは Guinea Pig Maximization

Test (GPMT)(7)と Buehler Test (8)である。GPMTは通常 Freund's Complete Adjuvant (FCA)を被験物質と乳化して皮内投与することにより感作誘導を行い、3週間程度の期間を空けて感作を成立させる。その後、閉塞パッチテストにより感作誘発し、その皮膚反応を観察するのが一般的な手法である。この Adjuvant を用いる試験法にはいくつかの変法が報告されているが、その一例を挙げると、皮内投与が適当でない被験物質に対して有効な方法である Adjuvant & Patch 法がある(9)。この方法は、乳化した FCAを皮内注射した部位に被験物質を経皮的に閉塞適用し、感作誘導する。その後、感作誘発を開放適用で行い、皮膚反応を評価する方法である。どちらの方法にしても Adjuvant を用いることにより、モルモットの感作性に対する感受性を高めて被験物質を評価するため、弱い感作性を持った化学物質のヒトに対する外挿を考えたリスクアセスメントをする際には現段階では最も信頼性の高い方法と考えられる。しかしながら、Adjuvantを用いた試験法は実験手技上、実験動物に対する負担が大きく、動物実験

代替法のRefinementの観点から考えると負荷が高い。これに対して、Buehlar TestはAdjuvantを用いないために感受性が低いという短所があるが、一方では実験動物に対する負荷は相対的に低く、人為的に感受性に対する感受性を高める操作をしていないことからヒトに外挿する場合にはより適切なモデルであるという議論もある。実際、GPMTは感度が高すぎるため、その結果を単純にヒトに外挿することは適切でないとする意見も一部にはあり、ヒトへの外挿を考える上では目的により適切な方法を選択する必要がある。

Mouse Ear Swelling Test (MEST)は従来のモルモットを用いたモデルと同様に感作誘発反応を評価するものである(10)。一般的な方法ではマウス腹部を剃毛した後に4日間の開放適用で被験物質を投与して感作誘導を行う。最初の投与から10日目に耳介で感作誘発を行い、その耳介腫脹をダイヤルシクネスゲージ等により測定するものである。この方法は免疫学の研究で頻りに用いられる遅延型アレルギーの評価法を試験法として利用したものである。耳介腫脹を測定することは皮膚反応を視感判定により評価する方法よりは定量的と考えられるが、耳介腫脹の正確な測定にはかなり熟練を要する。特に中程度以下の感作性物質の場合や刺激性を伴った被験物質の評価は留意する必要がある。中程度以下の感作性物質を捕らえるためにビタミンAをマウスに食餌投与する方法(VA-MEST)(11)も提案されているが、多くの被験物質を用いた報告はなされていない。

Local Lymph Node Assay (LLNA)もマウスを用いた試験法であるが、他の方法と大きく異なり、感作誘導反応を評価しているため、試験期間が短いという長所がある。一般的に行われている方法は被験物質をマウス耳介に3日間連続で塗布し、4日目に³H-thymidineを尾静注する。その6時間後にリンパ節を切除し、リンパ節組織中に含有される放射活性を測定することにより、リンパ節細胞の増殖性を評価するものである(12)。この他に*ex vivo*のLLNAとして、リンパ節細胞培養系での³H-thymidineの取り込みを評価する方法(13)、感作性物質による細胞数の上昇とCD25陽性細胞数を測定

する方法(14)、さらに増殖に替えてIL-2産生を評価する方法(15)等いくつかの方法が提案されている。

3. OECDガイドラインにおける感作性試験

(1) OECDガイドラインの構成

OECD毒性試験ガイドライン406では皮膚感作性試験について収載されているが、従来より汎用されてきたモルモットによる感作性試験に加えて、1992年の改定ではマウスを用いたスクリーニング試験法が明文化された(16)。例として挙げられている試験法にはモルモットの系としてGPMT、Buehlar Testがあり、マウスの系ではLLNAおよびMESTがあるが、その基本的な構成はモルモットの系を用いたリスクアセスメントおよびマウスを用いたスクリーニング試験からなる。

試験系にマウスを用いることはモルモットに比べて、系統遺伝学的により低位な種(phylogenetically lower species)を使用することで動物実験代替的な意義の側面がある上に、例示されている方法では用いる個体数を削減できるという利点がある。また、モルモットに比べてマウスは免疫学の基礎研究が進んでいることから、研究に使うことのできる様々な抗体等の材料が入手しやすいため、免疫学的手法により研究を行うことが可能である。しかしながら、ガイドラインに収載されているスクリーニング試験法(MESTおよびLLNA)のいずれの方法にしてもAdjuvantを用いたモルモットの方法の感度には及ばないことから、False negativeが生じることが予想される。そのため、これらマウスを用いる試験法はスクリーニング試験として収載され、これらの方法で陽性となったものを感作性物質と結論しても構わない(R43のラベルを付ける)という位置付けにとどまっている(Fig.3)。

(2) LLNAの現状

OECDガイドラインに収載されているスクリーニング試験にはマウスによる2種類の試験法が例示されているが、これら2種の中でもMESTは免疫学の基礎研究で一般

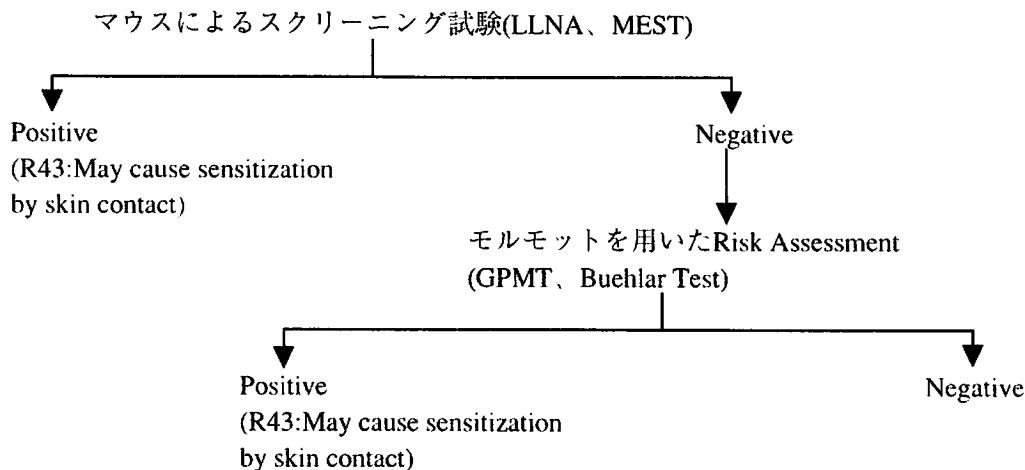


Fig. 3. OECD ガイドラインにおける感作性試験法の構成

的に使用されているが、化学物質の安全性評価に対する検討はやや少ない。一方、LLNA は様々な形で安全性評価への応用が研究されている。試験法として感度を高めるためにマウスの系統の検討 (17)、試験スケジュールの検討 (18) や構造活性相関の検討 (19) 等、様々な研究が報告された。さらに LLNA と GPMT のデータを比較した研究から、LLNA による判定結果は GPMT と同様な結果となったことが報告されたことより、実際の感作性評価に対するの基準が示された (20)。現在では数施設間でのバリデーションが終わり、その施設間再現性が良好であったことが報告され、また、1998 年よりアメリカの Interagency Coordination Validation of Alternative Methods (ICCVAM) で LLNA に関するレビューが始まることになり、今後大きく実用化に向けた動きがあると考えられる。

(3) GPMT と LLNA の比較

GPMT と LLNA の試験法について比較を行った (Table 1)。GPMT と LLNA は使用する動物種だけでなく、いくつかの点で異なる点がある。一番大きく異なる点は感作応答を評価する時期が GPMT は感作誘発期であるのに対して、LLNA は感作誘導期であることから、試験に必要な期間が大きく異なる。GPMT は試験開始から 3 週間以上の期間を必要とするが、LLNA は動物を使う

期間はわずか 4 日間である。また、GPMT は被験物質の投与が皮内注射であるのに対して、LLNA は経皮投与である。それ以外にも、使用する動物数や Adjuvant の使用の有無等が異なっている。

これらの違いを基に、GPMT と LLNA の長所および短所についてまとめた (Table 2)。モルモットを用いた GPMT は感作性の予測試験としては歴史もあり、多くの試験機関あるいは研究機関で実際に使われている評価の確立された方法である。そのため、多くのデータの蓄積があることから、対象とする化学物質が市場で起こす可能性のある副作用について予測しやすいという長所がある。その反面、古くから用いられている皮膚反応のみを視感評価するため、必ずしも客観的な方法とはいえず、様々な免疫学的指標を評価することができない。また、動物実験代替法という観点からも改善の方向が考えられている。試験期間という観点からでは明らかに LLNA の方が動物に対する負荷が小さい。また、LLNA は Adjuvant を使用しないため、この点からも動物に対する負荷は小さい。さらに、コスト、客観的な測定値が得られること等からも優位性がある。しかし、放射性同位体の使用が簡便性に欠けることと中等度以下の感作性物質に対する感度がやや低い点が短所と考えられる。

Table 1. GPMTとLLNAの比較

	GPMT	LLNA原法
動物種	モルモット	マウス
個体数 (対照群も含む)	30	12
動物試験期間	長い (24日)	短い (4日)
アジュバント	あり	なし
投与経路	皮内注射	塗布
判定期	感作誘発相	感作誘導相
判定方法	肉眼判定	³ H-thymidine取り込み
定量性	肉眼判定のため主観が入る可能性あり	客観的
コスト	高い	割安
感度	高い	中等度

Table 2. 試験法の長所と短所

試験法	長所	短所
GPMT	<ul style="list-style-type: none"> ・高感度 ・リスクアセスメントの蓄積データがある ・交差反応性を評価できる 	<ul style="list-style-type: none"> ・試験期間が長い ・動物試験代替法的観点から相対的に負荷が大きい ・皮膚反応を評価するため定量性は高くない
LLNA	<ul style="list-style-type: none"> ・試験期間が短い ・定量値が得られる ・動物試験代替的にbetter 	<ul style="list-style-type: none"> ・放射性同位体を使用する ・感度はやや低い ・交差反応を評価できない

(4) 新しい指標を用いたLLNA

この方法の最大の利点は放射活性の測定を客観的に行うことができることである。しかしながら、この放射性同位体の使用は放射性廃棄物の問題が生じるため、特に日本においては簡便に使用できる方法とはいえない。この欠点を改良するために、動物に放射性同位体を投与することなくリンパ節を切除し、*in vitro*での³H-thymidineの取込により増殖性を評価する方法等、いくつかの変法が報告されている。我々はこのLLNAでリンパ節細胞を細胞培養し、その培養上清中のIL-2量をenzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)にて定量する方法、リンパ節細胞培養で誘導されるサイトカインmRNAの発現を定量する方法によ

り、被験物質の感作性の予測試験を開発してきた。これらの指標と感作性物質によるリンパ節の腫大およびリンパ節細胞サブセットの細胞比率の変化を組み合わせることにより、感作性予測の感度を高めた。ELISA法ではIL-2量を基本指標として補正を行ったCorrected IL-2 Indexが3以上を判定基準として感作性を判断すると、中程度以上の感作性物質を捕らえることが可能となった(21)。また、より感度を高めることを目的に行ったmRNA Indexの検討ではLLNAの感作誘導期間を変更し、遺伝子定量装置ABI PRISM 7700による各種サイトカインmRNAの定量法を確立し、LLNA原法の改良へ応用を行った結果、中程度の感作性物質に対する感度を高めることができ

た(22)。

4. まとめ

OECDガイドライン収載の感作性試験法と共に我々の検討してきたLLNAについて解説した。動物実験代替法の観点から考えると、OECDガイドラインでは動物を使わない方法は未だ提案されておらず、世界的なレベルで認知されたReplacementは存在していない。しかし、ヒト末梢血からIL-4およびGM-CSFにより誘導された樹状細胞を感作性評価に使う方法などが報告されてきており、今後の研究の進展が期待される。

5. 参考文献

- Hatao, M., Itagaki, H., Kobayashi, T. and Ozawa, T. (1996) Current Topics In Cosmetic Safety Testing. *Environ. Dermatol.*, 3 (Suppl.1), 103-118.
- Barrat, M. D., Basketter, D. A., Chamberlain, M., Adams, G. D. and Langowski, J. J. (1994) An Expert System Rulebase for Identifying Contact Allergens. *Toxicol. in Vitro.*, 8, 1053-1060.
- Enslin, K., Gombar, V. K., Blake, B. W., Maibach, H. I., Hostynek, J. J., Sigman, C.C. and Bagheri, D. (1997) A Quantitative Structure-Toxicity Relationships Model for the Dermal Sensitization Guinea Pig Maximization Assay. *Fd. Chem. Toxicol.*, 35, 1091-1098.
- 板垣宏、加藤忍、内山真理子、小林敏明、藤山喜雄(1986) 接触感作物質の *in vitro* での評価法：電気泳動による蛋白質の結合性の検討。日本化粧品科学会 第11回学術大会要旨集(東京), 38.
- Reutter, K., Jager, D., Degwert, J. and Hoppe, U. (1997) In Vitro Model for Contact Sensitization: II. Induction of IL-1b mRNA in Human Blood-Derived Dendritic Cells by Contact Sensitizers. *Toxicol. in Vitro.*, 11, 619-626.
- Kligman, A. M. and Epstein, W. (1975) Updating the Maximization Test for Identifying Contact Allergens. *Contact Dermatitis*, 1, 231-239.
- Magnusson, B. and Kligman, A. M. (1969) The Identification of Contact Allergens by Animal Assay. *The Guinea Pig Maximization Test. J. Invest. Dermatol.*, 52, 268-276.
- Buehler E. V. (1965) Delayed Contact Hypersensitivity in the Guinea Pig. *Arch. Dermatol.*, 91, 171-177.
- Sato, Y., Katsumura, Y., Ichikawa, H., Kobayashi, T., Kozuka, T., Morikawa, F. and Ohta, S. (1981) A Modified Technique of Guinea Pig Testing to Identify Delayed Type Hypersensitivity Allergens. *Contact Dermatitis*, 7, 225-237.
- Gad, S. C., Dunn, B. J., Dobbs, D. W., Reilly, C. and Walsh, R. D. (1986) Development and Validation of an Alternative Dermal Sensitization Test: The Mouse Ear Swelling Test (MEST). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 84, 93-114.
- Thorne, P. S., Hawk, C., Kaliszewski, S. D. and Guincy, P. D. (1991) The Noninvasive Mouse Ear Swelling Assay. I. Refinement for Detecting Weak Contact Sensitizers. *Funam. Appl. Toxicol.*, 17, 790-806.
- Kimber, I., Hilton, J. and Weisenberger, C. (1989) The Murine Local Lymph Node Assay for Identification of Contact Allergens: A Preliminary Evaluation of in situ Measurement of Lymphocyte Proliferation. *Contact Dermatitis*, 21, 215-220.
- Kimber, I., Mitchell, J. A. and Griffin, A. C. (1986) Development of a Murine Local Lymph Node Assay for the Determination of Sensitizing Potential. *Fd. Chem. Toxicol.*, 24, 585-586.
- de Silva, O., Perez, M. J., Pineau, N., Rougier, A. and Dossou, K. G. (1993) Local Lymph Node Assay: Study of the In Vitro Proliferation and Control of the Specificity of the Response by FACScan Analysis. *Toxicol. In Vitro*, 7, 299-303.
- Hatao, M., Hariya, T., Katsumura, Y. and Kato, S. (1995) A Modification of Local Lymph Node Assay for Contact Allergenicity Screening: Measurement of Interleukin-2 as an Alternative to Radioisotope-Dependent Proliferation Assay. *Toxicol.* 98, 15-22.
- OECD (1992) OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 406, Skin Sensitization, Adopted by the Council on 17th July 1992, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Kimber, I., Kinnaird, A., Peters, S. W. and Mitchell, J. A. (1990) Correlation between Lymphocyte Proliferative Response and Dendritic Cell Migration in Regional Lymph Nodes following Skin Painting with Contact-Sensitizing Agents. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 93, 47-53.
- Kimber, I. and Dearman, R. J. (1991) Investigation of Lymph Node Cell Proliferation as a Possible Immunological Correlate of Contact Sensitizing Potential. *Fd. Chem. Toxicol.*, 29, 125-129.
- Basketter, D. A., Roberts, D. W., Cronin, M. and Scholes, E. W. (1992) The Value of the Local Lymph Node Assay in Quantitative Structure-Activity Investigations. *Contact Dermatitis*, 27, 137-142.
- Basketter, D. A. and Scholes, E. W. (1992) Comparison of the Local Lymph Node Assay with the Guinea Pig Maximization Test for the Detection of a Range of Contact Allergens. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, 65-69.
- Hariya, T., Hatao, M. and Morikawa, Y. (1995) A New Index in Ex Vivo Local Lymph Node Assay for Moderate Sensitizers. *Environ. Dermatol.*, 2 (Suppl. 2), 39.
- Shibata, M., Hariya, T., Hatao, M., Ashikaga, T. and Ichikawa, H. (1998) Determination of Cytokine Gene Expression in Regional Lymph Node during Contact Hypersensitivity. *J. Dermatol. Sci.*, 16 (Suppl.1), S190.