

皮膚感作性試験代替法h-CLATの有用性の検討

小野 恭司^{a,c}, 山口 敦美^b, 中村 義昭^a, 栗田 雅行^a, 高野 伊知郎^c, 中江 大^d, 永山 敏廣^e

動物福祉の観点から動物実験に対する見直しが図られてきており、皮膚感作性試験においては動物実験代替法としてヒト細胞株活性化試験 (h-CLAT) の開発が進められている。h-CLATはヒト単球由来細胞株THP-1細胞の表面に発現するCD86及びCD54を指標とする*in vitro*皮膚感作性試験である。 *in vivo*皮膚感作性試験の局所リンパ節増殖法 (LLNA) (OECD Test Guideline 429) で陽性が示されている染毛料用色素のHC青2 (HB2) 及びHC赤1 (HR1) についてh-CLATを行い、h-CLATの動物実験代替法としての有用性を検討した。

まず、THP-1細胞に被験物質を曝露させ24時間培養後、抗ヒトCD86抗体及び抗ヒトCD54抗体で染色した。次に、フローサイトメトリーで測定したCD86及びCD54の発現量から相対蛍光強度 (RFI) を算出し、陽性基準を満たすかを調べた。その結果、2種類の染毛料用色素はともに陽性が示され、LLNAの結果と一致した。したがって、h-CLATが動物実験代替法として有用であることが確認された。

キーワード : 動物実験代替法, h-CLAT, 皮膚感作性, 染毛料用色素, *in vitro*, THP-1, CD86, CD54

はじめに

平成22年度に全国の消費生活センターに寄せられた危害の内容の第2位は化粧品などによる皮膚障害であり¹⁾、安全性の確保が重要となっている。皮膚障害の一つである接触性皮膚炎の原因物質を明らかにするためには、皮膚感作性が疑われる物質の感作能を評価することが欠かせない。これまで、皮膚感作性の評価法としては主にモルモットやマウスなどの動物が用いられてきたが、動物の権利や福祉の観点から動物実験に対する規制が強化されてきており、動物を用いない試験法の開発が急務となっている。そこで、OECDによって公定法化がなされた局所リンパ節増殖法 (Local Lymph Node Assay ; LLNA) (OECD Test Guideline 429) で陽性が示されている染毛料用色素2種についてヒト細胞株活性化試験 (human Cell Line Activation Test ; h-CLAT) を行い、h-CLATの動物実験代替法としての有用性を検討したので、報告する。

皮膚感作性試験とh-CLAT

1. 皮膚感作性のメカニズム及び試験法

皮膚感作性のメカニズム及び試験法をFig. 1²⁾に示す。皮膚感作性は、原因となる化学物質が皮膚に接触、浸透することで起こる免疫反応である。まず皮膚感作性物質が皮膚

に接触、経皮吸収され、次いでタンパク質と結合することで樹状細胞 (dendritic cell ; DC) に貪食される。貪食したDCは活性化し、所属リンパ節に遊走する。所属リンパ節でT細胞はDCから抗原提示を受け活性化し、増殖する。ここまでの過程を誘導と呼んでおり、再度同一の皮膚感作性物質に接触すると増殖したT細胞から炎症性サイトカインが放出され、紅斑や浮腫などの炎症が引き起こされる。この過程を惹起と呼んでいる。

皮膚感作性試験法はこのメカニズムの一部を試験管内や動物で再構築しているが、Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) はタンパク質との結合能を、h-CLATはDCの活性化を、LLNAはT細胞の増殖を、モルモットマキシミゼーション法 (Guinea Pig Maximization Test ; GPMT) やヒトパッチテストは炎症の度合いを評価する。LLNAとGPMTは動物を使用する方法であり、DPRAとh-CLATは動物を用いない方法である。

2. h-CLAT

THP-1細胞に皮膚感作性物質を曝露すると、T細胞の活性化に欠かせない共刺激分子CD86やCD54の発現が上昇し、周辺の細胞の増殖、分化、活性化に関与するTNF- α やIL-8が産生され、抗原提示するためのMHC分子の細胞内移行

^a 東京都健康安全研究センター医薬品部微量分析研究科 (当時)

169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター環境保健部生体影響研究科 (当時)

169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^c 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科

169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^d 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^e 東京都健康安全研究センター食品化学部

169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

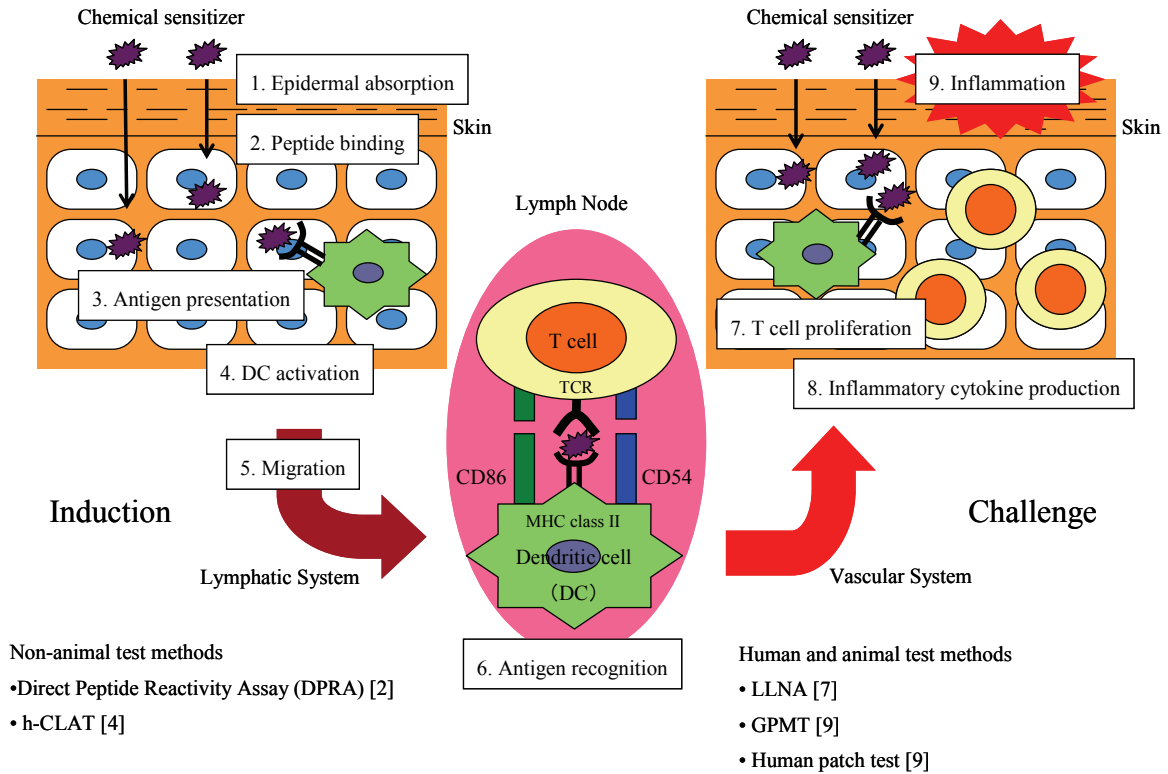


Fig. 1. Mechanism and Test Methods on Skin Sensitization

が増加することが見出された^{3,4)}。これらの現象は皮膚感作性物質を曝露した際のDCと同様の反応であり、国内企業2社の共同研究によってTHP-1細胞を用いて皮膚感作性物質を評価する方法がh-CLATとして開発された^{5,6)}。h-CLATは、欧州化粧品工業会（COLIPA）加盟5社及び日本化粧品工業連合会加盟7社における施設間再現性評価はすでに終了しており、現在公的機関のバリデーションとして、欧州代替法試験センター（ECVAM）主導による国際バリデーションが行われている⁷⁾。

実験方法

1. 被験物質

1) HC青2 (HB2)

化学名は2,2'-{[4-(2-hydroxyethyl)amino-3-nitrophenyl]imino}bisethanolで、化学構造をFig. 2(a)に示す。欧州消費者製品科学委員会（SCCP）の意見書⁸⁾によると、LLNAでマウスにおける皮膚感作性は示されているものの感作力は不明で、感作性を示し始める濃度は5%程度としている。

Aldrich社製を購入し、DMSOを溶媒に用いて調製した。

2) HC赤1 (HR1)

化学名は4-amino-2-nitrodiphenylamineで、化学構造をFig. 2(b)に示す。SCCPの意見書⁹⁾によると、LLNAで強い感作性が示され、5%程度で感作性を示し始めるとしている。また、GPMTでは極めて強い感作性が示され、誘導のための0.1%の皮内注射で感作が成立するとしている。さらに、ヒトパッチテストでは3%染毛基剤懸濁液で皮膚感作性を

示すとしている。

ナミキ商事社から購入し、DMSOを溶媒に用いて調製した。

2. 対照物質

陽性対照物質である1-chloro-2,4-dinitrobenzene（DNCB）は関東化学社製、同じく陽性対照物質であるnickel(II) sulfate hexahydrate（Ni）はSIGMA社製、陰性対照物質であるsodium dodecyl sulfate（SLS）はSIGMA社製を用いた。

DNCBはDMSOを、Ni及びSLSは生理食塩水を溶媒に用いて調製した。

3. 試薬

FITC標識抗ヒトCD86抗体（Clone：FUN-1）はBD Pharmingen社製、FITC標識抗ヒトCD54抗体（Clone：

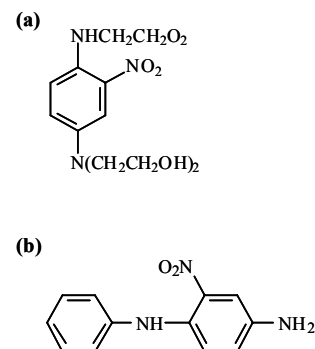


Fig. 2. Structural Formulae of HB2 (a)

6.5B5) 及びFITC標識マウスIgG1 (Clone : DAK-GO1) はDako社製を用いた. Propidium iodide (PI), PBS, ウシ血清アルブミン (BSA), 及びヒトγグロブリンはSIGMA社製を用いた.

4. 装置

フローサイトメトリーには, ベックマン・コールター社製Cell Lab Quanta™ SCシステムを用いた.

5. 細胞

1) 細胞培養

ヒト単球性白血病由来株化細胞THP-1をATCCから購入した. 10% FBS (MP Biomedicals社製), 1%ペニシリン-ストレプトマイシン (GIBCO社製), 0.05 mM 2-mercaptoethanol (和光純薬社製) を含むRPMI1640培地 (GIBCO社製) を用いて, 37°C, 5% CO₂で培養し, 培養開始後2週間から2ヶ月以内の細胞を使用した.

2) 細胞応答

本施設においてh-CLATを実施するにあたり, 対照物質を用いて6. 実験に示した方法でh-CLATを行い, THP-1細胞の応答性を調べた.

DNCB (陽性対照物質) では, CD86, CD54ともに3回中3回陽性基準が満たされ (Fig. 3(a)), 陽性と判断した.

Ni (陽性対照物質) では, CD86, CD54ともに3回中3回陽性基準が満たされ (Fig. 3(b)), 陽性と判断した.

SLS (陰性対照物質) では, CD86, CD54ともに3回中3回陽性基準が満たされず (Fig. 3(c)), 陰性と判断した.

以上から, 本施設において細胞応答に問題がなく, 正しく感作性を判定できることが示された.

6. 実験

文献¹⁰⁾にまとめられている方法に基づき, 以下のように行った.

1) 濃度設定試験

THP-1細胞に適用する被験物質の濃度を定めるため, 濃度設定試験を行った.

被験物質の溶解性を生理食塩水で確認し, 溶解した場合は溶媒に生理食塩水を用い, 溶解しなかった場合は溶媒にDMSOを用いた.

96穴プレートにあらかじめ48~72時間前培養したTHP-1細胞を 1.6×10^5 細胞/160 μ L/wellになるように播き, 細胞毒性を考慮した濃度の被験物質 (公比2で数濃度) を24時間曝露させた. 0.1% BSAを含むPBS (FACS buffer) で細胞を洗浄後, PIで細胞を染色した. フローサイトメトリーで細胞の生存率を測定し, 生存率75%に相当する濃度 (CV75) を設定した.

2) 本試験

24穴プレートにあらかじめ48~72時間前培養したTHP-1細胞を 1×10^6 細胞/1 mL/wellになるように播き, 公比1.2でCV75及び高濃度側に1濃度, 低濃度側に6濃度の計8濃度の

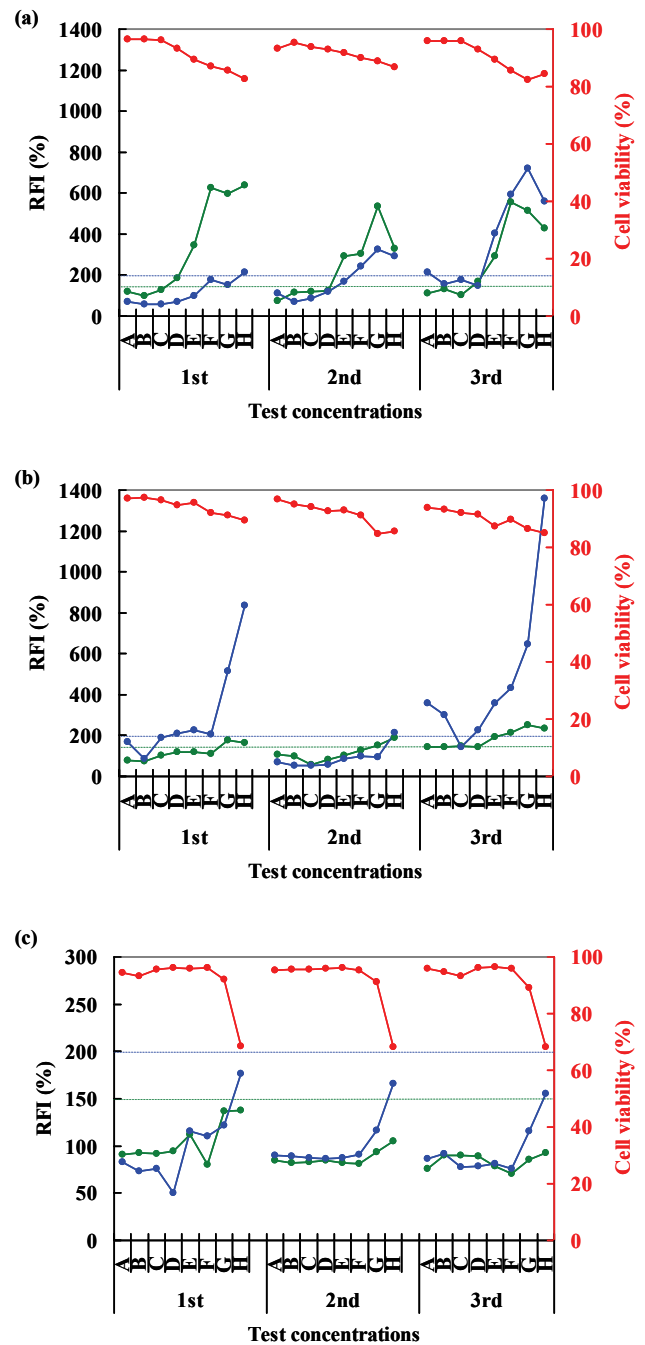


Fig. 3. RFI Values (%) of CD86 (●)/CD54 (●) and Cell Viability (%) (●) of DNCB (a), Ni (b), and SLS (c). The positive criteria are RFI value of 150% (CD86; ...) and 200% (CD54; ...), respectively. CV75 values (μ g/mL) for DNCB, Ni, and SLS are 2.5, 55, and 48, respectively. The concentrations of each test are A = CV75/1.2⁶; B = CV75/1.2⁵; C = CV75/1.2⁴; D = CV75/1.2³; E = CV75/1.2²; F = CV75/1.2; G = CV75; and H = CV75 \times 1.2.

被験物質を24時間曝露させた. FACS bufferで細胞を洗浄後, 細胞表面のFcレセプターを0.01%ヒトγグロブリン溶液でブロッキングした. 細胞をFITC標識抗ヒトCD86抗体で染色する群, FITC標識抗ヒトCD54抗体で染色する群, 及びアイソタイプコントロールであるFITC標識マウス

IgG₁で染色する群の3群に分け、各々染色した。FACS bufferで細胞を洗浄後、更にPIで細胞を染色した。フローサイトメトリーで測定したCD86, CD54, 及びアイトタイプコントロールの幾何平均蛍光強度 ((geometric) mean fluorescence intensity ; MFI) から、以下の式で相対蛍光強度 (relative fluorescence intensity ; RFI) を算出し、陽性基準「1濃度でもCD86のRFIが150%以上またはCD54のRFIが200%以上」を満たすかを調べた。一被験物質あたり試験を2回または3回行い、2回以上同じ結果が出ればその結果を採用した。ただし、生存率が50%未満の場合、その濃度におけるデータは採用せず、また8濃度のうち少なくとも4濃度において生存率が50%以上でなければ、再度濃度設定試験を実施し、再試験を行うこととした。

$$\text{RFI (\%)} = \frac{\text{被験物質処理細胞のMFI} - \text{被験物質処理細胞のアイトタイプコントロールのMFI}}{\text{溶媒処理細胞のMFI} - \text{溶媒処理細胞のアイトタイプコントロールのMFI}} \times 100$$

結果及び考察

HB2については、3回試験を行い (Fig. 4(a)), 3回ともいづれの濃度においても生存率が50%以上であった。CD86は3回ともRFIが150%以上となった濃度が存在し、CD54は2回のみRFIが200%以上となった濃度が存在したことから、陽性と判断した。

HR1については、2回試験を行い (Fig. 4(b)), 2回ともいづれの濃度においても生存率が50%以上であった。CD86は2回ともRFIが150%以上となった濃度が存在し、CD54も2回ともRFIが200%以上となった濃度が存在したことから、陽性と判断した。

以上のように、LLNAで陽性が示されているHB2及びHR1について、h-CLATでも陽性が示され結果が一致したことから、h-CLATが動物実験代替法として有用であることが確認された。

これまでにも化粧品成分や医薬部外品成分などについてh-CLATとLLNAで皮膚感作性評価の比較がなされ、84%の相関性が示されている¹⁰⁾が、更なる偽陽性、偽陰性の問題の改善や疎水性サンプルの細胞への適用法の検討などに取り組む必要がある。

皮膚感作性の生体内メカニズムは複雑であるため、1つの*in vitro*皮膚感作性試験法のみで動物実験を代替することは困難である。そのため、複数の*in vitro*試験法を組み合わせた評価系の構築が必要となっている。既に化学物質の性質、タンパク質結合性、樹状細胞活性化、及びT細胞増殖に関する*in vitro*試験を組み合わせたスコアリングシステム¹¹⁾が公的ではないが提案されており、評価系の充実が図られてきている。こうしたh-CLATを含む*in vitro*皮膚感作性試験に対する取り組みによって動物実験代替試験法が確

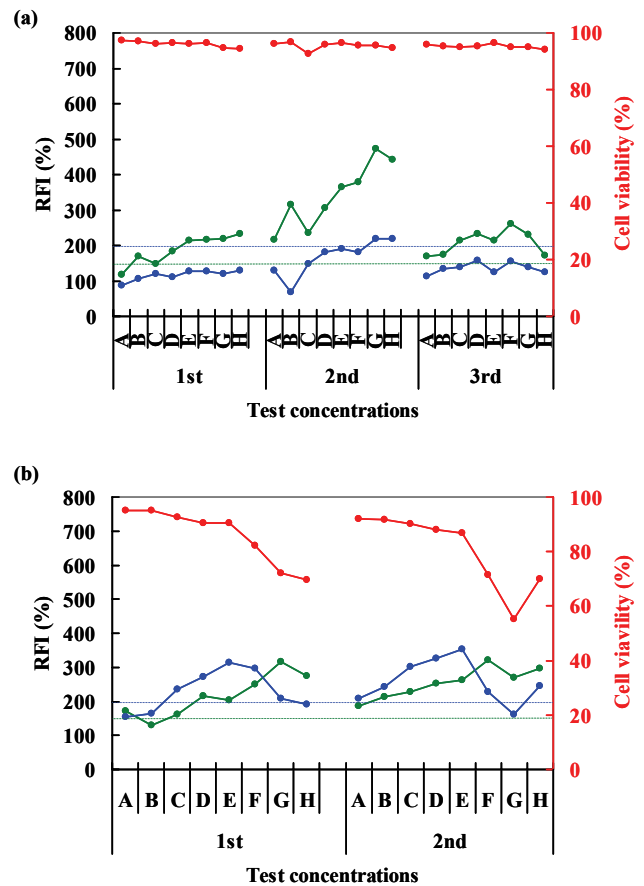


Fig. 4. RFI Values (%) of CD86 (●)/CD54 (●) and Cell Viability (%) (●) of HB2 (a) and HR1 (b). The positive criteria are RFI value of 150% (CD86; ...) and 200% (CD54; ...), respectively. CV75 values ($\mu\text{g/mL}$) for HB2 and HR1 are 700 and 96, respectively. The concentrations of each test are A = CV75/1.2⁶; B = CV75/1.2⁵; C = CV75/1.2⁴; D = CV75/1.2³; E = CV75/1.2²; F = CV75/1.2; G = CV75; and H = CV75 \times 1.2.

立され、化粧品や家庭用品などの生活用品について、接触性皮膚炎の原因物質の特定、更には健康被害の未然防止につなげることが期待される。

文 献

- 1) 国民生活センター：消費生活年報2011, 46-50, 2011.
- 2) 額田祐子, 坂口齊：ファルマシア, 44(9), 875-879, 2008.
- 3) Ashikaga, T., Hoya, M., Itagaki, H., *et al.*: *Toxicology in Vitro*, 16, 711-716, 2002.
- 4) Yoshida, Y., Sakaguchi, H., Ito, Y., *et al.*: *Toxicology in Vitro*, 17, 221-228, 2003.
- 5) Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., *et al.*: *Toxicology in Vitro*, 20, 767-773, 2006.
- 6) Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., *et al.*: *Toxicology in Vitro*, 20, 774-784, 2006.
- 7) 吉村孝一：FRAGRANCE JOURNAL, 39(12), 56-62,

- 2011.
- 8) SCCP: Opinion on HC Blue No. 2, Doc. No. 1035, 2006.
- 9) SCCP: Opinion on HC Red No. 1, Doc. No. 0981, 2006.
- 10) Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., *et al.*: *ATLA*, **38**, 275-284, 2010.
- 11) Jowsey I. R., Basketter, D. A., Westmoreland, C., *et al.*, *J. Appl. Toxicol.*, **26**, 341-350, 2006.

Study on the Usefulness of the Alternative Method h-CLAT for Skin Sensitization Testing

Yasushi ONO^a, Atsumi YAMAGUCHI^b, Yoshiaki NAKAMURA^a, Masayuki KURITA^a,
Ichiro TAKANO^a, Dai NAKAE^a and Toshihiro NAGAYAMA^a

Due to the call to review animal testing in the name of animal welfare, development of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) as alternative method for skin sensitization testing has improved. The h-CLAT is an *in vitro* skin sensitization test using the expression of THP-1 cell (a human monocytic leukemia cell line) surface CD86/CD54 as indicators. The local lymph node assay (LLNA), OECD Test Guideline 429, is an *in vivo* skin sensitization test. Using the h-CLAT, we examined the skin sensitization of the hair dyes HC Blue No. 2 and HC Red No. 1, which had produced positive results in the LLNA, and studied the usefulness of h-CLAT as an alternative skin sensitization testing method.

After THP-1 cells had been exposed to the test chemical for 24 h, cell staining with FITC-conjugated anti-human CD86 antibody or FITC-conjugated anti-human CD54 antibody was carried out. The relative fluorescence intensity was calculated according to CD86/CD54 expression, measured by flow cytometry, and used to determine positive or negative results. The h-CLAT suggested that the 2 hair dyes were positive. This was consistent with the LLNA results. The h-CLAT is expected to be a useful alternative method to animal testing.

Keywords: alternatives, h-CLAT, skin sensitization, hair dye, *in vitro*, THP-1, CD86, CD54

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan