

動物を用いない化学物質の安全性試験 ～OECD 皮膚感作性試験代替法～

はじめに

医薬部外品や化粧品は様々な製品が販売されており、わたしたちの生活においてとても身近な化学製品といえます。直接皮膚に使用されることも多いことから、安全性がなによりも優先されます。原料の安全性評価にあたっては、単回投与毒性、皮膚刺激性など基本的に評価すべき項目がガイドライン¹⁾で定められており、今回ご紹介する皮膚感作性もその一つです。

皮膚刺激性とは、刺激性のある化学物質が一度皮膚に接触するだけで皮膚組織に直接炎症反応を引き起こすことを言い、これにより湿疹、紅斑、浮腫などの症状が現れます。一方、皮膚感作性とは、遅延型アレルギーに分類されるアレルギー反応で、抗原となる化学物質が何回か皮膚に接触した後、再度皮膚に接触することで免疫反応を引き起こすことを言い、これによりかぶれが生じます。すなわち、皮膚感作性は時間をかけて発症します。このように、皮膚刺激性と皮膚感作性は見た目には似たような症状を呈しますが、症状が起こるメカニズムは異なります。医薬部外品や化粧品は日々繰り返し皮膚に塗布する製品も多いことから、原料中の皮膚感作性を評価することは重要です。

皮膚感作性をはじめとする生体への有害な反応の多くは複雑な経路を経て発症するため、従来は細胞試験ではなく実験動物を用いた試験で評価されてきました。一方、動物福祉の観点から 2013 年 3 月に欧州連合域内で動物実験を経た化粧品の販売が禁止²⁾されたことを皮切りに、動物を用いない代替法へのシフトが世界中で広がってきています。

OECD(経済協力開発機構 Organisation for Economic Co-operation and Development)は代替法の開発を積極的に進めており、皮膚感作性試験においても、発症までをいくつかの事象に分け、それぞれの事象に対する化学物質の影響の有無を個々に評価できる試験法が開発されたことで、動物を用いずに評価できる手法の整備が進められているところです。

今回は、動物を用いない皮膚感作性試験について、皮膚感作性のメカニズムとともにご紹介いたします。

皮膚感作性のメカニズム

皮膚感作性の発症には感作性物質(抗原)に対する反応性を獲得する「感作」の段階と、アレルギー反応を発症させる「惹起」の二つの段階があるとされています(図-1)。

皮膚感作性は複雑なメカニズムにより発症します。その発生機序は 2012 年に OECD が公表した AOP(Adverse Outcome Pathway)³⁾により整理されてきたところです。AOP とは、日本語では有害性発現経路と呼ばれており、一般的には化学物質などが個体または集団に有害性をもたらす経路であり、化学物質のばく露から、吸収・分布・代謝の過程及び分子、細胞、組織・臓器・器官、個体に生じる連続的な事象のことを言います。

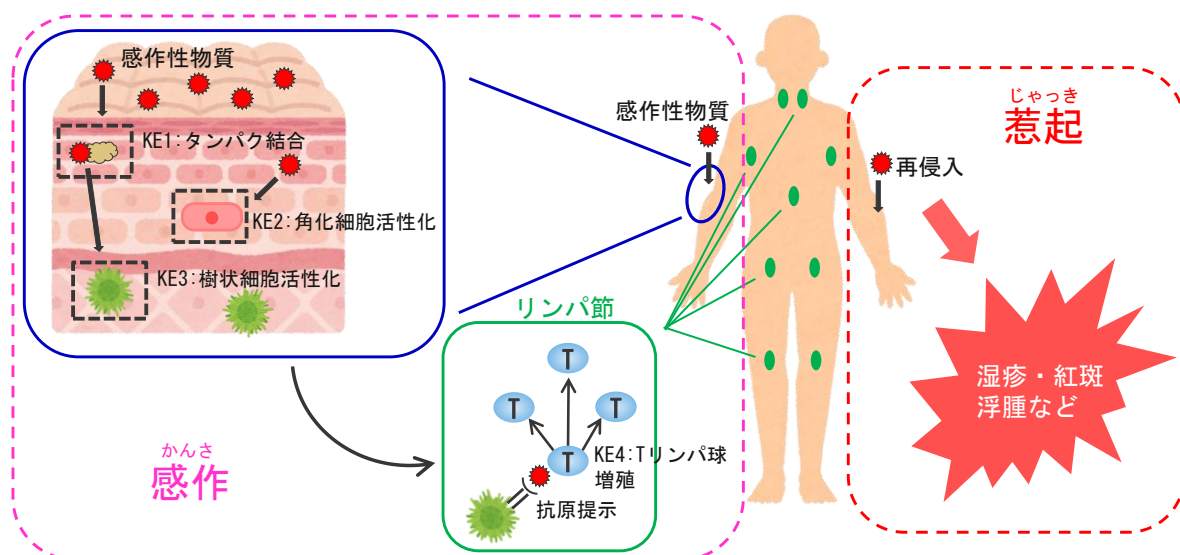


図-1 皮膚感作性の全体像

OECDがまとめた化学物質による皮膚感作性のAOP³⁾によれば、4つの主な事象(Key Event: KE)を経て感作が成立するとされています(表-1)。

表-1 皮膚感作性の AOP

段階	Key Events	皮膚感作性の主な事象
感作	KE1	化学物質とタンパク質の共有結合
	KE2	角化細胞の活性化
	KE3	樹状細胞の活性化
	KE4	リンパ節における T リンパ球の増殖
惹起	有害性発現	アレルギー性皮膚炎

KE1 では、化学物質が皮膚バリアを通過して生体内タンパク質と共有結合します。皮膚感作性を引き起こす化学物質はほとんどが分子量 1,000 以下の化学物質で「ハプテン」と呼ばれます。ハプテンは分子量が小さいために単独では抗原とはなりません。皮膚バリアを通過して皮膚内部へと侵入すると、アルブミンなどの生体内に存在するタンパク質と結合します。このハプテン-タンパク結合物がアレルギー反応を引き起こす抗原となります。

KE2 では、抗原となった化学物質による傷害から細胞を保護するために表皮を形成する角化細胞が活性化し、ストレス反応を生じ炎症反応が起こります。

KE3 では、皮膚組織に散在する免疫担当細胞である樹状細胞が抗原となった化学物質を取り込み、活性化します。

KE4 では、活性化した樹状細胞が免疫反応を担うリンパ節に移動します。リンパ節では樹状細胞から免疫反応の主な担い手である T リンパ球に抗原情報が伝わることで、T リンパ球が活性化し、増殖します。

この KE1~KE4 の一連の流れが「感作」の段階であり、化学物質に対する T リンパ球の攻

撃準備段階といえます。

感作が成立した後、再び抗原となった化学物質が皮膚内に侵入してくると、感作と同様に化学物質を取り込んだ樹状細胞がリンパ節に移動し、Tリンパ球へ抗原情報を伝達します。感作の段階で攻撃の準備が整っていたTリンパ球は活性化し、今度は化学物質が侵入した場所へ移動して化学物質を排除に向かいます。この攻撃の時に放出される種々のサイトカインなどの伝達物質によって周辺組織が傷害を受けることで、湿疹や紅斑、浮腫といったアレルギー性皮膚炎の反応が現れます。攻撃の準備をしていたTリンパ球が攻撃を開始した結果として炎症反応が起こるのが「惹起」です。

動物を用いた皮膚感作性試験

皮膚感作性は複雑なメカニズムの下に発症するため、これまではモルモット⁴⁾やマウス^{5), 6), 7)}を用いて評価されてきました。

モルモットを用いた皮膚感作性試験としては、OECD TG 406⁴⁾に記載されている Guinea Pig Maximization Test や Buehler Test があります。いずれの方法も、動物個体に被験物質を適用して感作と惹起の工程を実施し、一定期間後に惹起部位における皮膚反応(紅斑、痂皮(かさぶた)及び浮腫)の有無を評点付けし、皮膚感作性の有無を判定します。すなわち、モルモットで実際に皮膚感作を起こし、皮膚反応そのものを評価する方法です。

マウスを用いた試験法としては、Local Lymph Node Assay (LLNA)があります。LLNAとは局所リンパ節試験のことで、表-1におけるKE4を評価する試験です。マウスの両耳介に被験物質を投与し、抗原(被験物質)刺激によるTリンパ球の増殖反応を指標とし皮膚感作性の強度を推定します。Tリンパ球の増殖は、放射性標識(トリチウム化チミジンの定量:OECD TG 429)⁵⁾、生物発光(Tリンパ球のATP含有量の定量:OECD TG 442A)⁶⁾、イムノアッセイ又はフローサイトメトリー(Tリンパ球のBrdU取り込み量の定量:OECD TG 442B)⁷⁾によって測定できます。LLNAはモルモットを用いた皮膚感作性試験に比べ、動物に与える苦痛の軽減や評価に用いる動物数の低減という点で意義ある代替法の一つとして位置づけられています。また、モルモットを用いた試験法は惹起時の皮膚反応を肉眼で判定しますが、LLNAはTリンパ球の増殖反応を数値で定量化できるため、より客観的な試験となっています。

動物を用いない皮膚感作性試験代替法

動物を用いない皮膚感作性試験代替法では、表-1におけるKE1~KE3をそれぞれ評価する試験法が開発されOECD TGに採択されています(表-2)。なお、これらの動物を用いない皮膚感作性試験代替法は、動物を用いた皮膚感作性試験のように単独の試験で皮膚感作性を評価することはできず、個々の代替法の結果を組み合わせで最終評価することとされています。

表-2 動物を用いない皮膚感作性試験代替法

Key Events	皮膚感作性の主な事象	OECD TG
KE1	化学物質とタンパク質の共有結合	OECD TG 442C ⁸⁾
KE2	角化細胞の活性化	OECD TG 442D ⁹⁾
KE3	樹状細胞の活性化	OECD TG 442E ¹⁰⁾

KE1：化学物質とタンパク質の共有結合

(1) 概要

皮膚感作性の AOP³⁾における KE1 として、化学物質が皮膚バリアを通過し生体内タンパク質と結合することが挙げられます。この時、皮膚感作性のある化学物質はタンパク質と共有結合し、皮膚感作性を引き起こす抗原となり得ます。この化学物質とタンパク質の結合力を評価するために採択された試験法が、OECD TG 442C「DPRA(Direct Peptide Reactivity Assay)」⁸⁾です。DPRA では、皮膚内のタンパク質の代わりに合成ペプチドであるシステイン含有ペプチド(Ac-RFAACAA-COOH)とリジン含有ペプチド(Ac-RFAAKAA-COOH)の2種類を使用します。被験物質と各ペプチドを混合し、24 時間後における未反応のペプチド量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分離定量します。

OECD TG 442C「Amino acid Derivative Reactivity Assay(ADRA)」⁸⁾は DPRA を改良した試験法で、システイン及びリジンの代わりに UV 吸収の強いナフタレン環を導入した N-(2-(1-ナフチル)アセチル)-L-システイン(NAC)及び N-(2-(1-ナフチル)アセチル)-L-リジン(NAL)を用います。NAC 及び NAL を被験物質と反応させ、未反応の NAC 量及び NAL 量を測定します(図-2)。ADRA は DPRA と比較し、被験物質の適用濃度が 1/100 であるため溶媒への可溶性が拡大することや、測定波長が DPRA で 220 nm であるのに対して ADRA では 281 nm であるため、測定対象である NAC 及び NAL のピークと被験物質のピークが重なりづらいことなど、DPRA を改良した面が多くあります。なお、弊財団では ADRA を受託しております。

(2) ADRA の試験方法及び評価法

被験物質を溶解した溶液と NAC または NAL 溶液を混合し、24 時間後における未反応の NAC 及び NAL を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分離定量します。NAC 及び NAL の減少率が 4.9 %以上の場合に陽性と判定します。

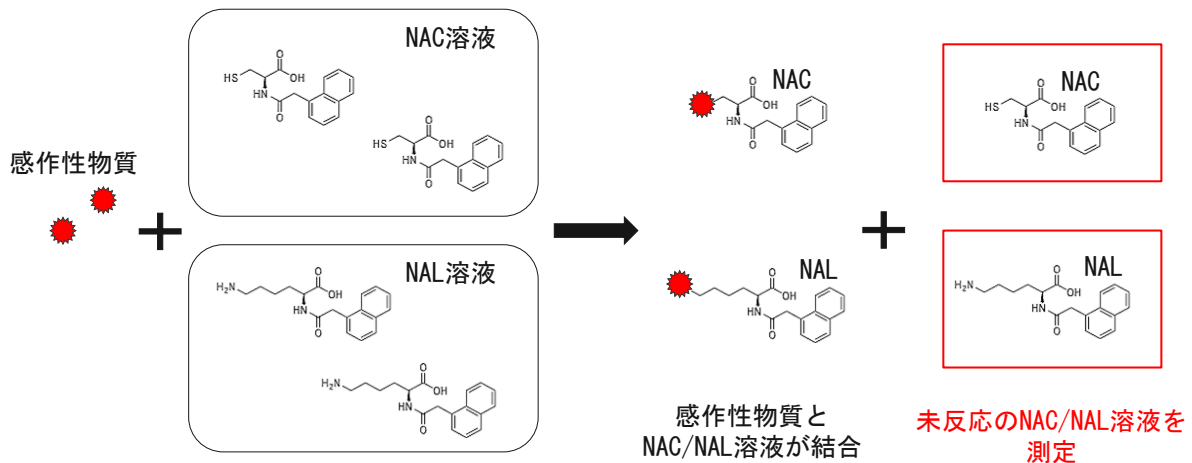


図-2 ADRA 法の原理

KE2：角化細胞の活性化

(1) 概要

皮膚感作性の AOP³⁾における KE2 として、角化細胞の活性化が挙げられます。角化細胞が角層バリアを通過した感作性物質にばく露されると、角化細胞が活性化し、Nrf2-Keap1-ARE 制御系を介してストレス応答遺伝子の発現が上昇します。このストレス応答遺伝子は、感作性物質による傷害からの細胞保護に働くと考えられています。レポーターアッセイ (ARE-Nrf2 Luciferase Test Method) は、このストレス応答遺伝子制御系を利用した試験法で、OECD TG 442D⁹⁾として 2015 年に採択されました。遺伝子組換え培養細胞株 KeratinoSens[™]及び LuSens を用いた 2 つの試験法が採択されており、弊財団では KeratinoSens[™]を用いた試験を受託しております。

感作性物質が角層バリアを通過して角化細胞にばく露されると、角化細胞が活性化し、Nrf2-Keap1-ARE 制御系を介してストレス応答遺伝子の発現が上昇します。一方、KeratinoSens[™]細胞には、化学発光を起こす遺伝子(ルシフェラーゼ遺伝子)が組み込まれているため、感作性物質にばく露されるとルシフェラーゼ遺伝子の発現が上昇します。このルシフェラーゼ遺伝子の発現産物であるルシフェラーゼ酵素と発光基質を反応させて発光強度を測定することで、被験物質による角化細胞の活性化の程度を評価します(図-3)。

(2) KeratinoSens[™]法の試験方法及び評価法

KeratinoSens[™]細胞に被験物質を溶解した液をばく露し、48 時間培養、その後発光基質を添加しルミノメーターで発光強度を測定します。同時に、細胞毒性試験(MTT アッセイ)を実施し細胞生存率を算出します。細胞生存率が 70 %を超え、かつ、被験物質をばく露していない対照とくらべて 1.5 倍を超える発現誘導がみられる場合に陽性と判定します。

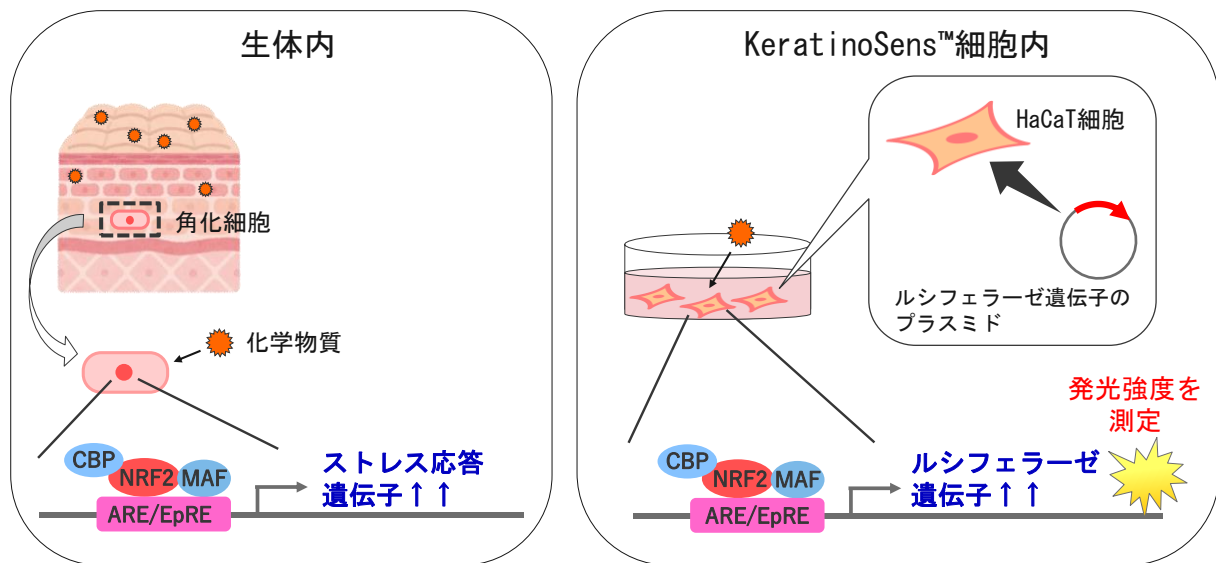


図-3 KeratinoSens[™]法の原理

KE3：樹状細胞の活性化

(1) 概要

皮膚感作性の AOP³⁾における KE3 として樹状細胞の活性化が挙げられます。樹状細胞は、感作性物質を取り込むことによって活性化します。活性化した樹状細胞では CD86・CD54 といった細胞表面分子が増加します。h-CLAT(human Cell Line Activation Test)法は、増加した CD86 及び CD54 を検出する試験法で、OECD TG 442E¹⁰⁾に収載されています。h-CLAT 法においてはこの二つの細胞表面分子の発現量変化を樹状細胞の活性化の指標としています(図-4)。

(2) h-CLAT 法の試験方法及び評価法

樹状細胞と類似の反応性を示す THP-1 細胞に被験物質を 24 時間ばく露させます。その後細胞表面の CD86 及び CD54 を蛍光染色し、蛍光強度をフローサイトメーターで測定します。細胞生存率が 50 %以上かつ CD86 及び CD54 の相対蛍光強度がそれぞれ 150 %以上及び 200 %以上となる結果が得られた場合に陽性と判定します。

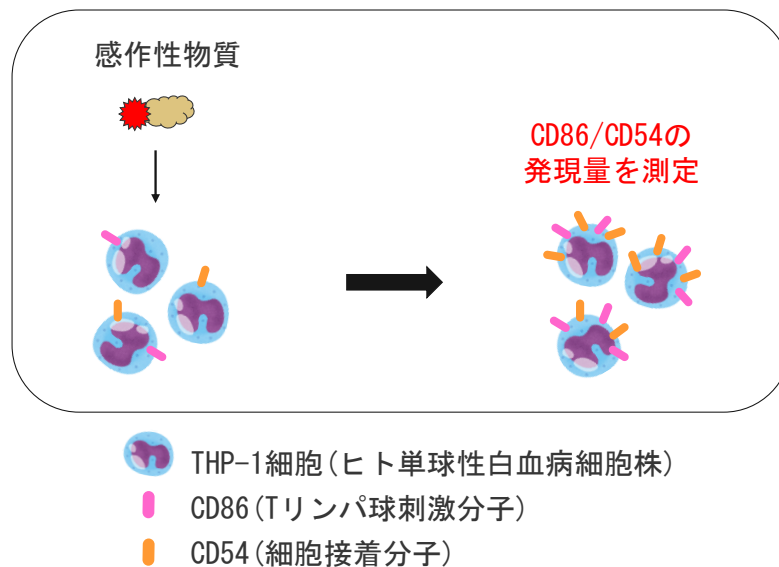


図-4 h-CLAT 法の原理

皮膚感作性試験代替法の評価

皮膚感作性は複雑な免疫反応であるため、動物を用いない皮膚感作性試験代替法単独で従来の動物を用いる試験を代替することは不可能とされています。また、各試験法には被験物質の適用限界があります。試験に用いる溶媒に溶解しない被験物質は適用できない他、試験法によって適さない物質は様々ありますので、試験を実施する際は注意が必要です。

皮膚感作性試験代替法の評価体系としては、国内ガイダンスでは「医薬部外品・化粧品

の安全性評価のための複数の皮膚感作性試験代替法を組合せた評価体系に関するガイダンスについて(薬生薬審発 0111 第 1 号)」¹¹⁾が発出されています。本ガイダンスではボトムアップ 3 out of 3 が提唱され、代替法 3 試験すべてで結果が陰性であれば、被験物質の皮膚感作性は陰性と判定できるとされています。しかしながら、裏を返すと、ボトムアップ

3 out of 3の考え方は偽陽性(本来は陰性である被験物質が陽性と判定されるケース)を生み出す可能性を含んでいます。これを回避するため、*in silico*の予測データや類縁物質など、他の情報を考慮することで皮膚感作性の有無を判断できる可能性もあることが示唆されています。今後、OECD TGにおけるより正しい評価のできる代替法の開発が期待されます。

おわりに

代替法の開発が広まっている理由として、動物実験の基本理念である3Rsがあります。3RsとはReplacement(動物を用いない方法への置き換え),Reduction(動物使用数の削減),Refinement(動物使用に伴う苦痛の軽減)の頭文字のRをとったものです。代替法と聞くと、動物を用いない方法への置き換えのみがイメージされるかもしれませんが、実験動物数の削減や苦痛の軽減も含まれます。医薬品や医療機器の開発では、動物使用数の削減や動物使用に伴う苦痛の軽減を考慮しつつも、ヒトでの臨床試験の前に動物実験による効果や副作用及び安全性の予測が欠かせません。一方で、医薬部外品や化粧品はReplacementを満たす、すなわち動物を用いない試験方法で安全性を予測することが求められてきています。ただし、現時点の技術では動物個体を用いずに生体を模倣することは不可能であるため、特に感作性試験については、一つの代替法で動物実験の代わりにはなりません。そのため、今回ご紹介したとおり、複数の手法を駆使して安全性を予測する必要があります。

弊財団で受託している代替法は他に皮膚刺激性/腐食性試験、眼刺激性/腐食性試験がございます。皮膚刺激性/腐食性試験はJFRLニュース Vol.6 No.34 Aug. 2020にてご紹介しておりますので、ぜひご覧ください。

参考資料

- 1) 日本化粧品工業連合会編. 化粧品の安全性評価に関する指針 2015 年. 薬事日報社, 2015.
- 2) REGULATION (EC) No 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 30 November 2009 on cosmetic products(recast). EUR-Lex.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1223&from=en>, (参照 2022-05-25)
- 3) The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins Part 1: Scientific Evidence. OECD.
[https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mo-no\(2012\)10/part1&doclanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mo-no(2012)10/part1&doclanguage=en), (参照 2022-05-25)
- 4) OECD TG 406: Skin Sensitisation. OECD iLibrary.
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-406-skin-sensitisation_9789264070660-en, (参照 2022-05-25)
- 5) OECD TG 429: Skin Sensitisation Local Lymph Node Assay. OECD iLibrary.
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-429-skin-sensitisation_9789264071100-en, (参照 2022-05-25)
- 6) OECD TG 442A: Skin Sensitization Local Lymph Node Assay: DA. OECD iLibrary.
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442a-skin-sensitization_9789264090972-en, (参照 2022-05-25)
- 7) OECD TG 442B: Skin Sensitization Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or -FCM. OECD iLibrary.
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442b-skin-sensitization_9789264090996-en, (参照 2022-05-25)
- 8) OECD TG 442C: *In Chemico* Skin Sensitisation Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins. OECD iLibrary.
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation_9789264229709-en, (参照 2022-05-25)
- 9) OECD TG 442D: *In Vitro* Skin Sensitisation ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. OECD iLibrary.
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442d-in-vitro-skin-sensitisation_9789264229822-en, (参照 2022-05-25)
- 10) Test No. 442E: *In Vitro* Skin Sensitisation *In Vitro* Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation. OECD iLibrary.
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-in-vitro-skin-sensitisation_9789264264359-en, (参照 2022-05-25)
- 11) 医薬部外品・化粧品の安全性評価のための複数の皮膚感作性試験代替法を組合せた評価体系に関するガイダンスについて(薬生薬審発 0111 第 1 号). PMDA.
<https://www.pmda.go.jp/files/000222425.pdf>, (参照 2022-05-25)