

博士論文

惹起相を含む皮膚感作性試験

LLNA : DAE 法の開発

(Development of skin-sensitization test that includes the
elicitation phase termed LLNA:DAE)

横浜国立大学大学院

工学府

山下邦彦

Yamashita Kunihiko

2016年9月

Abbreviations

2-MBT	2-mercaptobenzothiazole
AOO	Acetone: Olive oil (4:1, v/v)
AOP	Adverse Outcome Passway
ATP	Adenosine Triphosphate
BQ	p-Benzoquinone
BzCl	Benzalkonium chloride
C of SS potency	Class of Skin-Sensitizing Potency
CAS No	Chemical Abstracts Service Number
CMI	5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
DILL value	degree of increment of lymph node weight of left ear
DMF	N,N-dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNCB	2,4-Dinitrochlorobenzene
DNFB	2,4-Dinitrofluorobenzene
EC1mg%	Estimated Concentration needed to produce 1mg increment of LNW
EC3	Estimated Concentration needed to produce a stimulation index of 3
FCA	Freund's Complete Adjuvant
GHS	Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals
HCA	Hexyl cinnamic aldehyde
HQ	Hydroquinone
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
IEU	Isoeugenol
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-7	Interleukin-7
LNW	Lymph Node Weight
LNW of LE of CG	Lymph Node Weight of Left Ear for the Control Group.
LNW of LE of TG	Lymph Node Weight of Left Ear for the Test Group
LNW of LE	Lymph Node Weight of left ear
LNW of RE	Lymph Node Weight of right ear
Max LE Erythema Score	Maximum Left Ear Erythema Score
Max LE swelling	Maximum Left Ear swelling
Max RE Erythema Score	Maximum Right Ear Erythema Score
Max RE swelling	Maximum Right Ear swelling
MEK	Methyl ethyl ketone
MI	2-methyl-4-isothiazolin-3-one

NiCl ₂	Nickel chloride
NiSO ₄	Nickel(II) hexahydrate
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
PS	performance standard
REACH	Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals
Rlu	Relative light units
SI	Stimulation Index
SLS	Sodium Lauryl Sulfate
TC (%)	Test Concentrations
TG	Test Guideline
TSLP	Tymic stromal lymphopoietin

Test methods

DPRA	Direct peptide reactivity assay
GPMT	Guinea Pig Maximization Test
h-CALT	human Cell line Activation Test
LLNA:DA	LLNA modified by Daicel on based on ATP content
LLNA:DAE	Local Lymph Node Assay that includes the elicitation phase
MEST	Mouse Ear-Swelling Test
TG406	Test Guideline No.406 (GPMT)
TG429	Test Guideline No.429 (LLNA)
TG442A	Test Guideline No.442A (LLNA:DA)
TG442B	Test Guideline No.442B (LLNA:BrdU-ELISA)
TG442C	Test Guideline No.442C (DPRA)
TG442D	Test Guideline No.442D (KeratinoSense)

目次

序論

1. 化学物質の感作性評価の重要性	1
2. 皮膚感作とは	2
3. 皮膚感作性試験について	4
4. 現状の皮膚感作性試験の課題	14
5. 本研究の目的	15

第二章 マウスの左右耳介リンパ節を用いた惹起反応の検出に関する検討

本章における検討の背景と課題	18
----------------	----

検討結果	19
------	----

1. 左右のリンパ節の相同性の検討結果	
2. 左右のリンパ節の刺激に対する反応性の検討結果	20
3. 左右のリンパ節の独立性の検討結果	21
4. 惹起相を導入した新規 LLNA 法の試験スケジュールの検討結果	23
5. 惹起反応の濃度依存性の検討結果	27

考察	29
----	----

第三章 新規 LLNA:DAE 法の有効性の施設内検証

本章における検討の背景と課題	33
----------------	----

検討結果	40
------	----

1. 24 種類の化学物質を用いた新規 LLNA 法の検証結果	
---------------------------------	--

考察	48
----	----

第四章 独立した試験法としての LLNA:DAE 法

本章における検討の背景と課題	50
----------------	----

検討結果	53
------	----

1. 予備試験に用いる動物数の検討結果	
2. IEU 及び DNCB を用いた予備試験に関するモデル検討の結果	56
3. 惹起に必要な最低濃度の検討結果	58
4. 予備試験結果から本試験濃度を決定するスキームの検討結果	61
5. 9種の化合物を用いた試験方法の検証結果	62

考察	69
----	----

第五章 LLNA:DAE 法の結果の定量性に関する検討

本章における検討の背景と課題	71
----------------	----

検討結果	72
考察	80
第六章 LLNA:DAE 法を用いた交差感作性検出に関する検討	
本章における検討の背景と課題	82
検討結果	86
考察	90
第七章 LLNA:DAE 法及び in-vitro 法を用いた不飽和脂肪酸関連化合物の皮膚感作性評価	
本章における検討の背景と課題	92
検討結果	94
1. LLNA:DAE 法の結果	
2. DPRA 法によるペプチド反応性の検討結果	98
3. 交差感作性試験法を用いた特異性の検討結果	100
考察	102
第八章 LLNA;DAE 法を用いた界面活性剤の皮膚感作性評価	
本章における検討の背景と課題	107
検討結果	109
1. LLNA:DAE 法の結果	
2. 惹起濃度を変えた界面活性剤の惹起反応の検討結果	111
3. 交差感作性試験法を用いた特異性の検討結果	115
考察	117
第九章 総括及び結論	121
謝辞	126
実験の詳細	127
参照文献	150
付記	163

序論

1. 化学物質の感作性評価の重要性

化学物質の開発と使用において、安全性を評価することは、製品安全、労働安全の両面において非常に重要な項目である。

化学物質の安全性については、遺伝毒性、急性毒性、慢性毒性、生殖毒性など多くの観点で評価が必要とされているが、労働現場、日常生活において経皮的暴露により生じる可能性のある毒性影響の一つとして皮膚感作性がある。例えば、ヨーロッパにおいては、このような皮膚感作性反応に関係する労働損失日数が年間 300 万日にもものぼり、6 億ユーロもの損失になるとの見積もりもされている¹⁾。一方日本においても、化粧品や装飾品による被害の報告がある^{2,3)}。即ち化学物質に起因する皮膚障害を予防することは、化学物質を開発し、使用する上で必須な項目である。

化学物質が皮膚に与える影響としては、一過性の紅斑、浮腫などの症状に代表される皮膚刺激性と、免疫系を介して症状が現れる皮膚感作性がある。皮膚刺激性が一時的な影響であるのに対して、皮膚感作性に起因する影響は、生体の免疫機構が関与するため、毒性影響が長期にわたることが考えられ、日常生活への影響が大きいと考えられる。従って、化学物質の皮膚感作性を評価し、分類することは健康な社会生活のために極めて重要である。

これら皮膚感作性の評価と分類に関しては、例えば国連の **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)** の有害性分類においては、皮膚感作性のあるものは、区分1に分類される。この区分1に分類される物資は、“物質が相当な数のヒトに皮膚接触により過敏症を引き起こす証拠がある場合、または 適切な動物試験により陽性結果が得られている場合” と定義されている⁴⁾。即ち、GHSにおける分類は、ヒトにおける証拠と、動物実験結果を区別せずに活用している。

一方国内では、日本産業衛生学会において、皮膚感作性物質を、人における証拠の確かさを基に第一群、第二群、第三群に分類している⁵⁾。この分類において、

第一群は“人間に対して明らかに感作性がある物質”

第二群は“人間に対しておそらく感作性があると考えられる物質”

第三群は“動物試験などにより人間に対して感作性が懸念される物質”

と定義されている。動物試験の結果は、第三群にのみ活用される。これは、日本産業衛生学会の分類が、あくまでヒトにおける確からしさを基本に分類されているからである。

しかし、いずれにおいても化学物質の皮膚感作性の評価においては、人における証拠とともに、動物実験の結果が広く活用されているのが実情である。

以上述べたように、化学物質の皮膚感作性の評価は、健康で安全な生活を行ううえで、非常に重要である。

2. 皮膚感作とは

本研究論文においては、皮膚感作とは、化学物質などに経皮的に暴露した際に、その化学物質が免疫系に記憶され、再度暴露した際に、免疫的な反応が惹起される一連の反応と定義する。また、化学物質の皮膚感作を起す性質を皮膚感作性とし、当該物質を皮膚感作性物質（又は感作性物質）と定義する。更に、化学物質を感作性の有無により、感作性物質もしくは非感作性物質と表現し、化学物質の皮膚感作性の有無等を試験する方法を、皮膚感作性試験と定義する。また、それぞれの感作性物質の感作性の強さを、ヨーロッパ等で提案されている分類に従い“極度”“強度”“中程度”“弱い”の表現を使って区別する⁶⁾。また試験に供した物質を試験物質と表記する。

皮膚感作の成立には、大きく二つのステップがある。即ち、感作性物質との最初の接触により生じる誘導（induction）の段階、感作された化学物質等との再度の接触により生じる惹起（elicitation）の段階である。皮膚感作性のメカニズムの概略を図1に示した。

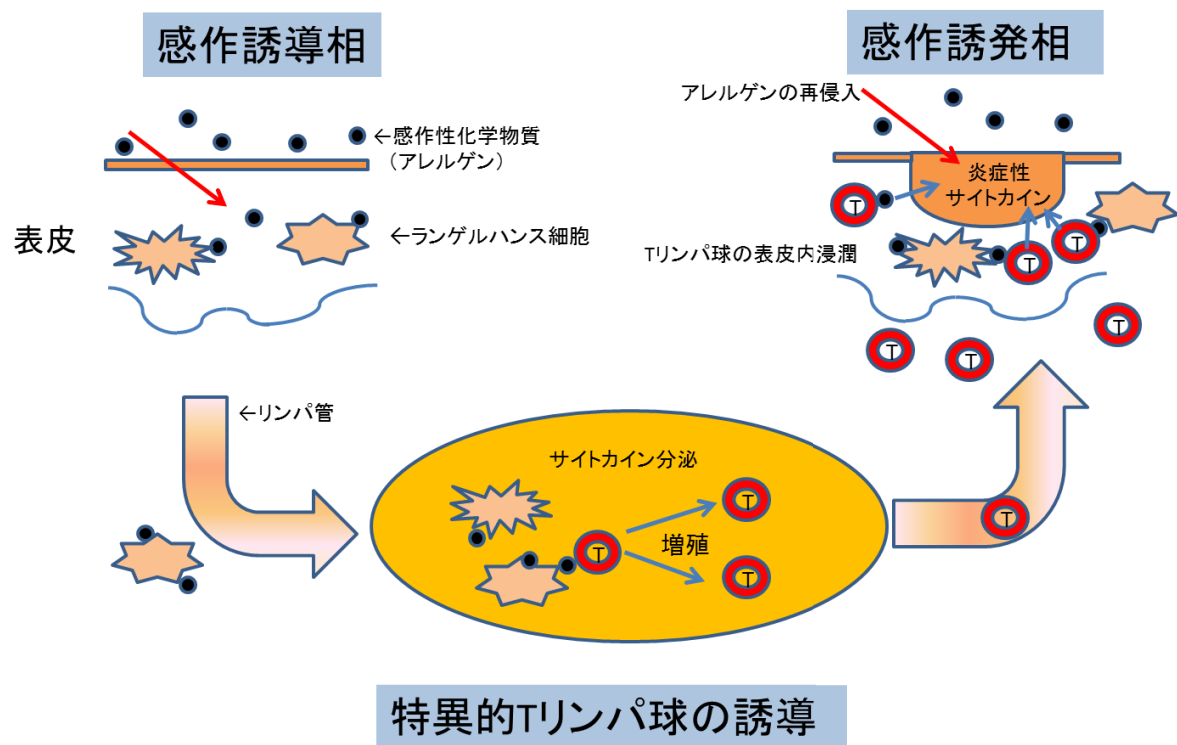


図1 皮膚感作性のメカニズム

皮膚感作性のメカニズムの概略を以下に示す

1. 皮膚感作性は、大きく感作誘導相(induction phase)と感作誘発相(elicitation phase)を含む。
2. 感作誘導相では、化学物質が表皮内に侵入し、表皮内のタンパク質と結合することでハプテンを形成し、それが抗原としてランゲルハンス細胞に認識され、リンパ節で特異的 T リンパ球の増幅が起こる。このとき、化学物質だけでなく異種タンパク質も抗原となりうる。
3. 感作誘発相では、化学物質の再暴露により、暴露部位において、既に感作された特異的リンパ球により、各種炎症性サイトカインが誘導され、速やかに炎症などが惹起される。

3. 皮膚感作性試験について

皮膚感作性を評価する試験法は、現在モルモットもしくはマウスを用いる *in-vivo* 試験及び細胞などを用いる *in-vitro* 試験が開発されている。

モルモットを用いる手法は、約 50 年前に確立され、近年まで皮膚感作性試験の第一選択であった。1980 年代になり、Kimber 等によりマウスを用いる Local Lymph Node Assay (LLNA) 法が開発され、Basketter 等による精力的な研究の結果、2002 年に Organization for Economic Co-operation and Development (OECD)により試験法として採択され、現在では第一選択となっている⁷⁻¹⁴。また、2010 年には、ラジオアイソトープを用いない新規 LLNA 法が開発され、新たに OECD に採択されている。

モルモットを用いる方法が、感作性の判定を惹起反応の検出により行うのに対し、LLNA では、感作誘導時の、マウス耳介リンパ節の増殖を指標として行うのが根本的な違いである。マウスにおいて惹起反応を検出する手法としては、Gad らにより、70 以上の物質を用いた Mouse Ear-Swelling Test (MEST) 法の結果が報告されている¹⁵⁻¹⁶。しかしながら、MEST 法においては、弱い感作性物質の検出が困難であり、中程度以上の感作性物質に有効であるとされており、単独の試験法としては十分ではない¹⁷。

現在 OECD に正式に採用された試験として、皮膚感作性評価に関しては、*in-vivo* の試験法と、*in-vitro* の試験法合わせて 6 つの Test Guideline (TG) が採択されている。動物を用いる試験は、1992 年に採択されたモルモットを用いる Guinea Pig Maximization Test (GPMT)法¹⁸、Buhler test 法¹⁹、及びマウスを用いる MEST 法を含む TG406²⁰、2002 年に採択され、2010 年に改訂されたマウスを用いる Local lymph node assay (LLNA)法 (TG429)²¹、2010 年に採択された LLNA modified by Daicel on based on ATP content (LLNA:DA)法 (TG442A)²²⁻²⁶ 及び LLNA:BrdU-ELISA 法 (TG442B)²⁷⁻²⁹ の 4 つである。MEST 法に関しては、TG406 において中程度感作性物質より強い場合に有効であるとされている。これらに加え、2015 年には動物を用いない *in-vitro* 試験法である Direct peptide reactivity assay (DPRA)法³⁰⁻³³と KeratinoSens 法³⁴⁻³⁶ がそれぞれ TG442C 及び TG442D

として採択された。更に、日本の化粧品メーカーが開発した human Cell line Activation Test (h-CALT) 法もガイドライン化が期待されている³⁷⁻³⁹⁾。しかしながら、これら in-vitro 法は、単独では動物試験を完全に代替する事は出来ないと考えられており、毒性メカニズムの発現機構を考慮した複数の試験法を組み合わせることが推奨されている⁴⁰⁾。この組み合わせの例としては、皮膚感作性の最初のステップである化学物質と生体のタンパク質との結合性を指標とした DPRA 法、化学物質の表皮細胞への炎症起因性を評価する KeratinoSens 法、リンパ球由来の細胞の免疫的応答を評価する h-CLAT 法があり、Urbish らは、これらの組み合わせの有効性を報告している⁴¹⁾。

ところで、試験法の選択において、動物試験を用いるか、或いは in-vitro 試験を用いるかは、本来試験物質の皮膚感作性を正確に評価できることを第一の選択基準にするべきであるが、一方 2003 年に公布され 2013 年に完全施行された欧州化粧品指令⁴²⁾により、化粧品原料に対する動物試験は厳しく制限された。今後は、開発された、或いは今後開発される in-vitro 試験法を如何に組み合わせるかが重要となる。

さて、これらの in-vitro 法の開発において、レファレンスデータとして広く用いられているのが、GPMT 法あるいは LLNA 法の試験結果である。なかでも、LLNA 法は、得られる結果の定量性が GPMT 法より優れていると考えられており、皮膚感作性の有無のみではなく、強度の評価にも用いられている。また、GPMT 法に比較して、使用する動物数が少なく、アジュバントの使用もなく、更に試験に要する時間も短いことから、より動物に優しい、即ち 3R(Refinement, Reduction, Replacement)の精神に沿った動物試験であると考えられる。これらの事から、現在では、ヨーロッパの化学品の登録制度である、Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH) 等において、動物試験の中で LLNA 法が第一選択とされている⁴³⁻⁴⁴⁾。また、既に 300 以上のデータが公開され、今後も動物試験としては、第一選択であると考えられる⁴⁵⁻⁴⁶⁾。即ち、今後も in-vitro 試験開発において必要な、基礎となるレファレンスデータは LLNA 法で提供されることが多いと考えられる。

次に上記代表的な皮膚感作性試験の原理、試験手順の概要を述べる。

モルモットを用いる GPMT 法の概略を図 2 に示した。GPMT 法では、感作段階において、アジュバントと混合した試験物質を、背部に皮下注射する。更に 1 週間後に同部位に 10% SLS を塗布し、24 時間後に試験物質を閉塞経皮暴露し、モルモットに感作誘導(induction)を行う。このときには、過度な刺激の出ない濃度で誘導を行う。次に、2 週間後に、刺激の出ない濃度の試験物質を、即腹部に貼付し皮膚の惹起 (elicitation) 反応を観察する。このとき、初回暴露では刺激の出ない濃度に対して、皮膚の炎症などの症状が出た場合に皮膚感作性陽性と判定する。また、結果は、感作された動物の割合で評価を行う。

図2 GPMT法 (Guinea Pig Maximization Test)

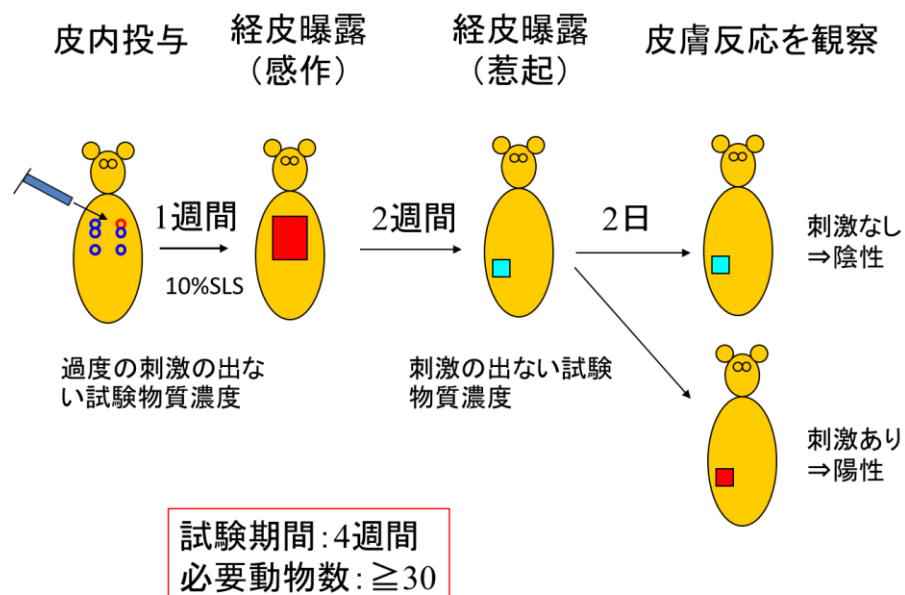


図 2 Guinea Pig Maximization Test (GPMT)法の概略

- 第0日目に、試験群の肩背部に、以下の3液をそれぞれ2箇所皮内注射する。
 - 注射 1: Freund's Complete Adjuvant(FCA)と水または生理食塩液の1:1 (v/v)の混合物
 - 注射 2: 適切な溶媒で所定濃度に調製した試験物質
 - 注射 3: FCA と水または生理食塩液の1:1 (v/v)の混合物で所定濃度に調製した試験物質
- 第5日～7日: 10% SLSを、注射部位を覆うように、経皮貼付により24時間の暴露を行う。
- 第6日～8日: 10% SLS塗布24時間後に、試験物質を、経皮貼付により48時間の暴露を行う。
- 第20日～22日: 試験物質を一方の腹側部に適用し溶媒を対側の腹側部に24時間適用する。
- パッチ除去の約21時間後に惹起区画をきれいにし、惹起適用開始から約24、48、72時間後、皮膚反応を観察し、紅斑及び浮腫を記録する。そして、コントロール群以上の皮膚反応を示した動物の割合で感作性を判定する。

* 試験のコントロール群は、試験物質の代わりに溶媒を用いて、同様の処理を行う。詳細はTG406¹⁸⁾を参照

次に LLNA 法について記載する。LLNA 法の概略を図 3 に示した。

LLNA 法では、試験物質を適切な溶媒、たとえばアセトンとオリーブオイルを 4:1(v/v)の割合で混合した AOO 溶媒などに溶解、或いは懸濁し、これを試験開始から 3 日間連続でマウスの左右耳介にそれぞれ 25 μ L ずつ塗布する。コントロール群には、溶媒を塗布する。このときコントロール群のほかに、試験群を 3 濃度以上設ける。次に試験開始 6 日後に放射性物質であるトリチウムチミジンを尾静注し、更に 5 時間後に両耳介のリンパ節を摘出し、取り込まれたトリチウムチミジンを測定する。判定は、コントロール群の動物のトリチウムチミジン取り込み量に対し、いずれかの試験物質暴露群の取り込み量が 3 倍を越えていれば感作性陽性とする。このコントロール群に対する試験群のリンパ節増殖の比を Stimulation Index (SI 値)といい、これは最終指標が異なる LLNA:DA 法や、LLNA:BrdU-ELISA 法など、これまで開発された LLNA 法全てに共通である。また、LLNA 法においては、この SI 値が 3 倍を越える推定濃度(EC3: Estimated Concentration needed to produce a stimulation index of 3)を 3 つの試験群のトリチウムチミジンの取り込み量と試験濃度から算出し、この EC3 の値によって異なる化学物質間の皮膚感作性強度 (ポテンシー) を評価する⁴⁷⁾。即ち、この値が小さいほど感作性が強いと言う判定になる。EC3 の計算方法を図 4 に示した。

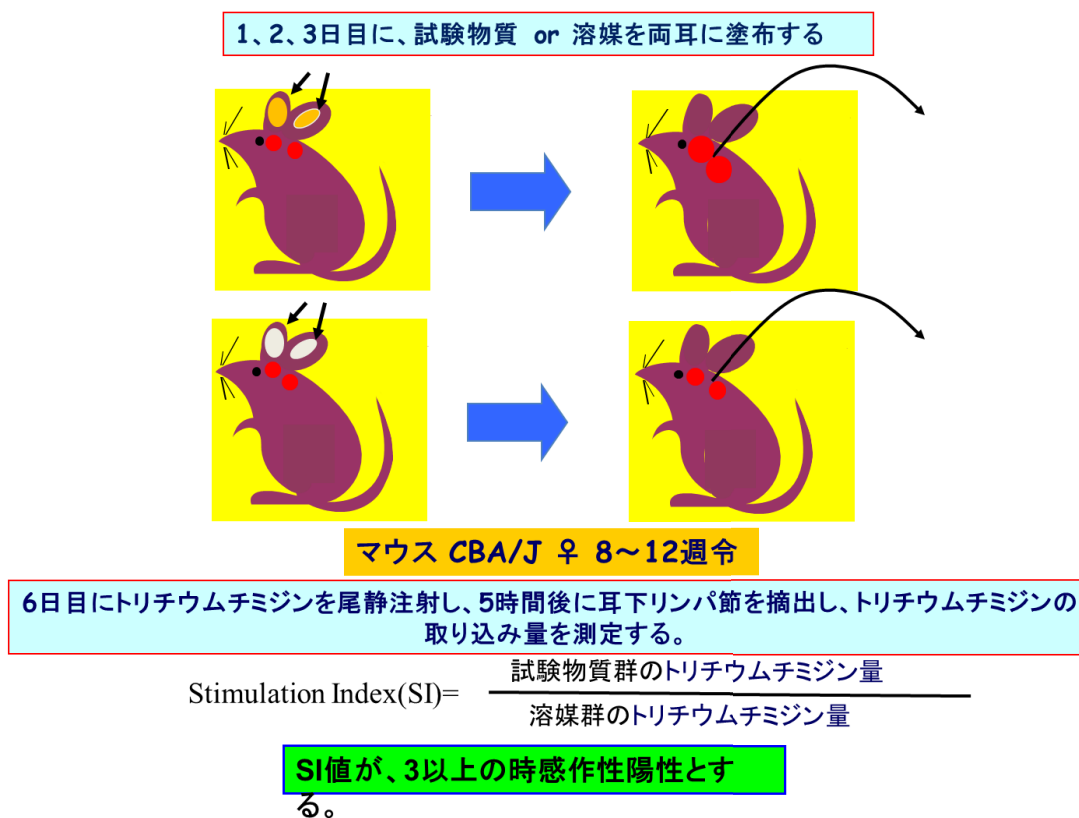


図3 LLNA法の概略

1. 試験群(n=4)のマウスには、1、2、3日目に、試験物質を溶解した試験液を両耳介に 25 μ L 塗布する。コントロール群には、溶媒を塗布する。試験群は通常連続した3濃度を用いる。
2. 6日目にトリチウムチミジンを尾静注射し、5時間後に耳介リンパ節を取り出す。細胞検濁液を調製後、5%トリクロロ酢酸(TCA)に4 $^{\circ}$ Cで18時間放置してDNAを沈殿させ取り込まれたトリチウムチミジンを β シンチレーションカウンターで測定する。
3. 試験群の取り込みが、コントロール群の3倍以上のとき感作性陽性とする。

*詳細は OECD TG429²¹⁾ を参照。

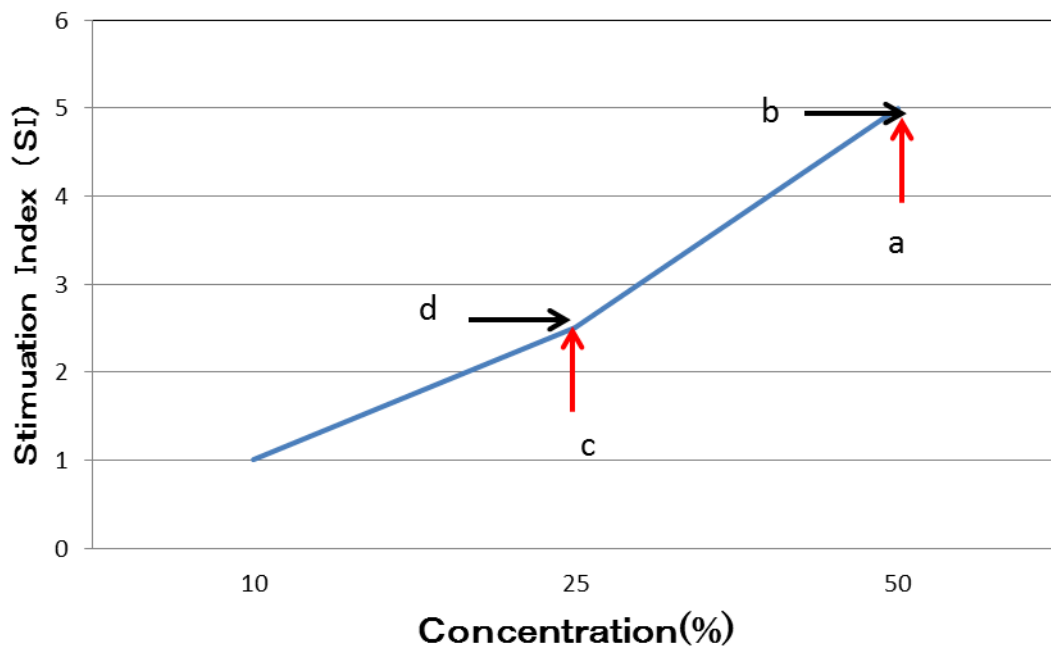


図4 EC3 値の計算方法

EC3 値は、以下の式に従い算出する

$$EC3=c+[(3-d)/(b-d)]\times(a-c)$$

a: SI 値が 3 を上回る最低濃度

b: a の濃度の SI 値

c: SI 値が 3 を下回る最高濃度

d: c の濃度の SI 値

次に我々が開発し、OECDにTG442Aとして採択されたLLNA:DA法について記載する。

LLNA:DA法の概略を図5に示した。

LLNA法とLLNA:DA法の大きな違いは次の3点である。まず第一番目は、LLNA:DA法では、試験物質暴露の1時間前に、1% SLS溶液を左右耳介に塗布し、その後LLNA法と同様の試験物質暴露を行う。第二番目は、LLNA法が試験開始後3日間の連続塗布であるのに対し、LLNA:DA法では7日目に4回目の投与を実施する。第三番目の違いは、LLNA法がリンパ節の増殖をトリチウムチミジンの取り込みで評価するのに対し、LLNA:DA法では8日目に摘出したリンパ節より細胞懸濁液を調製し、その細胞懸濁液のadenosine triphosphate (ATP)量を測定する。判定は、コントロール群の動物のATP量に対し、いずれかの試験物質暴露群の取り込み量が1.8倍を越えていれば感作性陽性とする。ただし、1.8倍以上2.5倍未満の場合は境界域陽性とする。

以上が、現時点における動物を用いる代表的な皮膚感作性試験の概要である。これら、皮膚感作性の毒性発現メカニズムは、近年Adverse Outcome Passway (AOP)としてまとめられており、これを近年発達したin-vitro法(DPRA,KeratinoSens,h-CLAT)の位置付けと共に図6に示した。

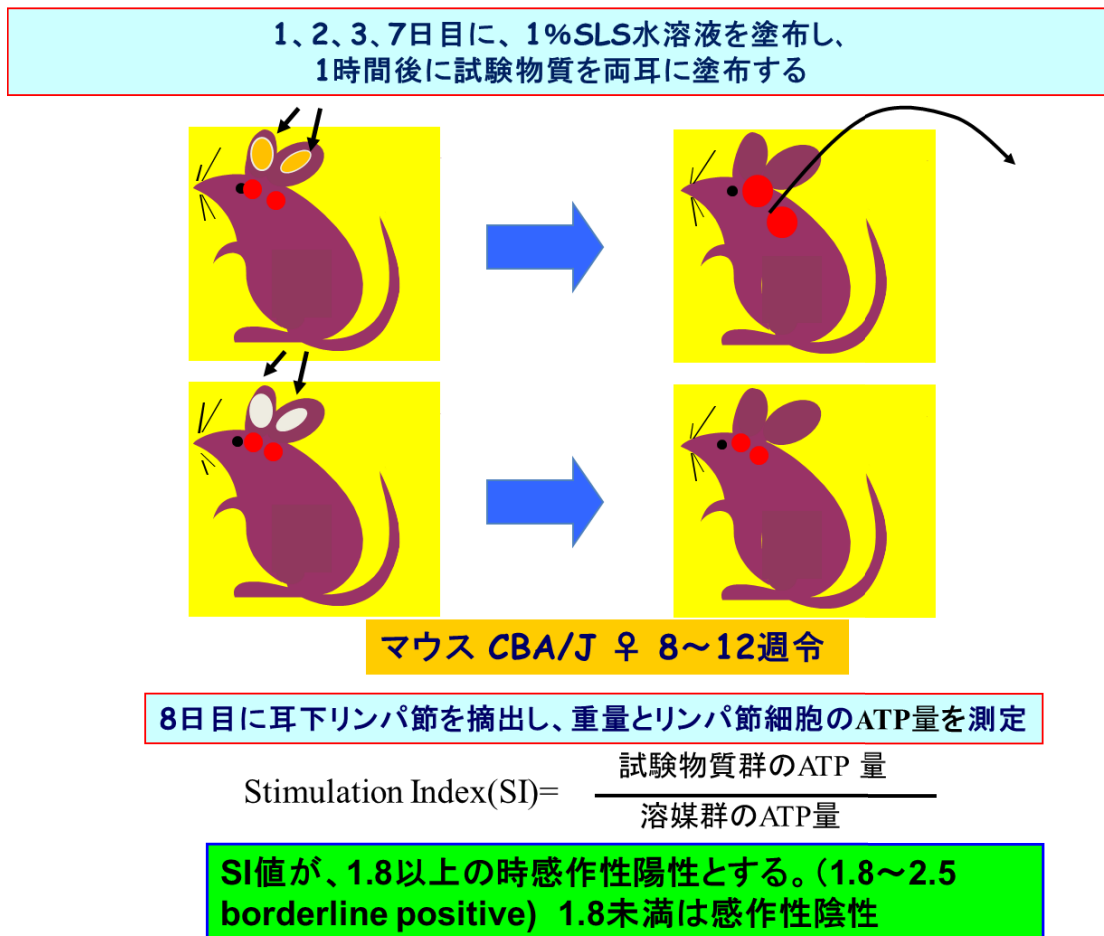


図5 LLNA:DA法の概略

1. 試験群(n=4)のマウスには、1、2、5、7日目に、試験物質を溶解した試験液を両耳介に25 μL 塗布する。コントロール群には、溶媒を塗布する。試験群は、通常連続した3濃度を用いる。試験物質もしくは溶媒塗布1時間前に1% Sodium lauryl sulfate (SLS)溶液を習字用細筆等を用いて塗布する。
2. 8日目に耳介リンパ節を取り出し、細胞懸濁液を調製する。
3. 細胞懸濁液中の細胞のATP量を、ATP測定試薬にて測定する。
4. 試験群のATP量が、コントロール群の1.8倍以上のとき感作性陽性とする。ただし、1.8以上2.5未満の場合は、境界域陽性として、更なる考察が必要とされる。

*詳細は OECD TG442A ²⁶⁾ を参照。

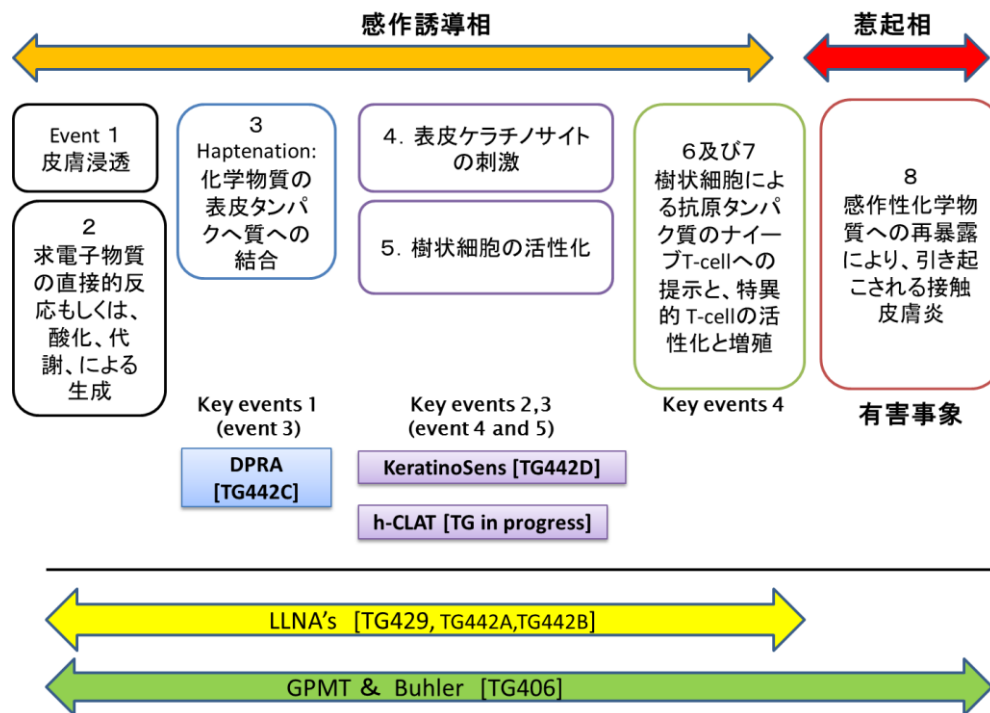


図 6 皮膚感作性に関するAdverse Outcome Pathway (AOP)

皮膚感作性に関するAOPと対応するin-vitro 試験法とin-vivo 試験法を示した。

1. 皮膚感作性試験は、8つのevent に分けられる。このうちDPRA法は、event 3の化学物質の表皮タンパク質への結合を模していると考えられる。KeratinoSensは、event 4の表皮細胞の刺激、h-CLATは、event 5の樹状細胞の活性化を模している。event 1及び2は、皮膚感作性に特異的なkey event では無い。現時点で、event 6～8に対応するin-vitro試験法は無い。
2. In-vivo 試験法のLLNA法は、event 7までに対応し、モルモットを用いる試験は、event 8まで全てを含む試験法である。現時点で、event 8まで含むLLNA法は確立されていない。

4. 現状の皮膚感作性試験の課題

近年、動物試験の第一選択とされている LLNA 法であるが、データが蓄積されるにつれ、以下に述べるいくつかの課題が明らかになってきている。

一点目の課題として、LLNA 法の代替法として開発された LLNA:DA 法及び、LLNA:BrdU-ELISA 法においては、偽陰性の判定を低減する目的で、明確な陽性とされる判定基準に追加して、境界域陽性という判定基準が追加された²⁶⁻²⁹⁾。LLNA:DA 法の感作性判定の ATP 値を指標にした SI 値の皮膚感作性ポテンシャルを判定するカットオフ値は 1.8 であるが、OECD ガイドラインによれば、1.8 以上 2.5 未満は境界域陽性とされ、境界域陽性の判定が出た場合には、得られた試験データの統計的分析、濃度依存性、既知の感作性物質との構造相関から最終的に陽性と判定するとある。同様に、LLNA:BrdU-ELISA 法のカットオフ値は 1.6 であり、1.6 以上 2 未満が境界域陽性とされる。この領域の結果を与える化学物質は、“皮膚感作性と皮膚刺激性を共に有する物質”と“皮膚刺激性しか有さない物質”のいずれも含まれる可能性がある。具体的には、LLNA:DA 法のバリデーション研究の過程において、一部の皮膚感作性物質、例えば 2-mercaptobenzothiazole が与えた SI 値は、2.3 であった。一方皮膚刺激性物質である chlorobenzene の与えた SI 値は 2.4 であった²⁵⁾。即ち、皮膚感作性物質と皮膚刺激性物質が、共に 1.8 以上 2.5 未満の領域の SI 値を与えた。このような結果において、偽陰性を防ぐために境界域陽性のカテゴリーが設けられた。

皮膚刺激性物質が、このような SI 値を与える原因としては、化学物質の皮膚刺激性に起因するリンパ節の非特異的増殖が一因であると考えられている。また、境界域陽性の結果が得られた場合には、明確に陽性と判定するか否かの具体的基準は明示されておらず、事実上境界域陽性の化学物質については、陽性と結論せざるを得ない状況がある。

二点目の課題として、交差感作性が検出できないという課題がある。交差感作性については、本論文第六章に詳細に述べるが、交差感作性とは、ある化学物質に感作された場合に構造類似の他の化学物質にも過敏に反応するようになることである。例えば一部の抗生物質間に交差感作性がある事が知られており、これは患者の治療において臨床的な問題を生じるこ

とが知られている⁴⁸⁾。先に述べたように、モルモットを用いた手法が、惹起反応を指標に感作性を検出するのに対し、LLNA法では、感作誘導相で感作性を判定する。即ち、モルモットを用いた手法は、感作段階と、惹起段階で異なる化合物を用いて評価することができるのに対し、LLNA法は惹起段階が存在しないため、原理的に化学物質間の交差感作性は評価できない。これは、モルモットを用いる手法に対し、LLNA法に共通する決定的な弱点である。

三点目として、特定の化学物質類のLLNA法の結果が、従来のGPMT法やヒトの知見と一致しないことが明らかとなってきた。これらの代表的なものとして、金属化合物、界面活性剤及び不飽和脂肪酸類があげられる。例えば、ヒトの知見、及びモルモットの試験で皮膚感作性陽性のニッケルは、LLNA法では陰性となる²¹⁾。洗浄剤などに用いられているSodium lauryl sulfate (SLS)などは、LLNA法では明確な陽性であるが、ヒトにおける症例が明確でないことから、これらは真の皮膚感作性を示すものではない、即ち偽陽性であるとされている^{49,50)}。また化粧品などに用いられているsqualeneなどの不飽和脂肪酸類が、LLNA法ではGPMT法に比べて陽性になる割合が高く、かつ感作性強度も強めに評価されることが報告されている⁵¹⁾。即ち、これらの物質に関しては、LLNA法の結果が、真の皮膚感作性ポテンシャル、或いはポテンシーを反映しているか明確ではない。界面活性剤は、化粧品並びにトイレタリー製品に広く用いられており、また不飽和脂肪酸類に関しても同様に日常生活において広く用いられている。即ちこれらの皮膚感作性を正確に評価することは、ヒトの健康を守るために非常に重要である。現在動物愛護の観点から、皮膚感作性評価に関する動物試験の第一選択はLLNA法である。これはすなわち、今後これらの化合物群については、この課題を抱えたままで、in-vitro試験のレファレンスともなるデータが蓄積されていくことを意味する。

以上が現状の動物を用いる皮膚感作性評価法の課題である。

5. 本研究の目的

これまで述べてきたように、化学物質の皮膚感作性は、職業現場並びに日常生活において

多くの影響を与える可能性があり、その評価と情報の活用が求められている。そして、化学物質の皮膚感作性評価のためにさまざまな *in-vivo* 並びに *in-vitro* の試験法が開発され活用されている。一方、これらの試験法にはそれぞれ特徴があり、GPMT 法の結果もしくはヒトの結果をレファレンスとした場合、LLNA 法や *in-vitro* の試験法の全ての結果が完全に一致するわけではない。特に、感作誘導段階で感作性を評価する試験法の特徴から、これまでの LLNA 法には前節に詳細に述べた次の三つの課題がある。

1. 化学物質の皮膚刺激性に起因する非特異的リンパ節増殖による偽陽性、更に LLNA:DA 法や LLNA:BrdU-ELISA 法では境界域陽性反応が発生する可能性があり、その場合、単独の試験では判定が困難である。
2. 惹起相において感作性を判定していたモルモットを用いる GPMT 法等では可能な、化学物質間の交差感作性が判定できない。
3. 一部の化学物質群、例えば不飽和結合を含む脂肪酸、界面活性剤などの結果が GPMT 法の結果やヒトの知見と一致しない。

これら 3 つの課題のうち、1 と 3 は、皮膚刺激性に起因する非特異的リンパ節増殖が主な原因であると考えられている。また 2 については、感作誘導相のみで皮膚感作性の評価を行う LLNA 法においては、本質的に解決が困難な課題である。即ち、この課題を解決するためには、結果の判定に皮膚刺激性の影響を受けることなく、かつ交差感作性を判定するために、惹起相で判定を行う新規 LLNA 法の確立が必要であると考えた。

このような背景から、本研究の目的は、上記 LLNA 法の課題を解決しうるマウスを用いた惹起相を含む新規皮膚感作性試験を確立し、それにより新規化学物質の開発と安全な利用に貢献することである。本目的を達成するために、以下に示す、第二章から第八章までの検討を行った。

本論文は、以下に示す九章より構成される。

序論

第二章 マウスの左右耳介リンパ節を用いた惹起反応の検出に関する検討

第三章 新規 LLNA 法の有効性の施設内検証

第四章 独立した試験法としての新規 LLNA 法(LLNA:DAE 法)の確立

第五章 LLNA:DAE 法の結果の定量性に関する検討

第六章 LLNA:DAE 法を用いた交差感作性検出に関する検討

第七章 LLNA:DAE 法及び in-vitro 法を用いた不飽和脂肪酸関連化合物の皮膚感作性評価

第八章 LLNA:DAE 法を用いた界面活性剤の皮膚感作性評価

第九章 総括及び結論

序論で、既存の皮膚感作性試験の概要と課題及び本研究の目的を示した。第二章から第五章までは、新規皮膚感作性試験法(LLNA:DAE)法の確立について示した。第六章から第八章では、LLNA:DAE 法の、既存試験法に対する優位性を示し、第九章で総括及び結論を述べた。

第二章 マウスの左右耳介リンパ節を用いた惹起反応の検出に関する検討

本章における検討の背景と課題

マウスにおいて、惹起反応を検出する試験法としては、序論で述べたいくつかの先行技術が報告されているが、もっとも研究報告が多いのは MEST 法である^{15,16)}。MEST 法では、除毛した腹部に化学物質を塗布して感作を誘導し、10 日目に、化学物質を耳介に暴露し、惹起反応は耳介の腫脹を測定することで評価する。また、腹部を用いた感作誘導の段階で、アジュバントを用いることも可能である。更に耳介の腫脹をエンドポイントとしている点で、原理的にはモルモットを用いる方法に極めて近い手法である。しかしながら、MEST 法は、Dunn 等の報告によれば、弱い感作性物質の評価が難しいことが明らかであり、OECD TG406 本文においても、陽性の結果の場合は更なる試験は必要ないと記載されているのみである¹⁶⁻²⁰⁾。このことは MEST 法で陰性であった場合、そのみで陰性とは判断できない事を示している。

即ち、マウスにおいて、惹起反応を指標に、弱い感作性物質を評価できる試験法は確立されていない。そこで、惹起相を含む新規 LLNA 法の開発を目的に、LLNA:DA 法の開発過程で培った知見をもとに、マウスの左右の耳介を感作と惹起に活用する、新規試験法の確立を目的として研究を行った。

本章では、マウスを用いた新規皮膚感作性試験法確立の第一段階として、以下に示す 5 つの項目について検討を行い、マウスの左右耳介リンパ節の刺激性物質及び感作性物質への反応について基礎的な検証を行った。

1. マウスの左右リンパ節の相同性の検討
2. 左右のリンパ節の刺激に対する反応性の検討
3. 左右のリンパ節の独立性の検討
4. 惹起相を導入した新規 LLNA 法の試験スケジュールの検討
5. 惹起反応の濃度依存性の検討

検討結果

1. 左右のリンパ節の相同性の検討結果

本研究で用いる CBA/J マウスの左右の耳介リンパ節の相同性を検討する目的で、ナイーブマウス(n=10) のリンパ節重量及び ATP 量を測定した。本研究におけるマウスの左右耳介リンパ節を図 7 に規定した。左右それぞれの耳介リンパ節を摘出し測定した結果、左右のリンパ節重量は $2.3 \pm 0.3 \text{mg}$ 及び $2.2 \pm 0.3 \text{mg}$ であり、ATP 量は、 $19,027 \pm 5,104 \text{ Rlu}$ 及び $17,314 \pm 4,982 \text{ Rlu}$ でありナイーブマウスの左右リンパ節の重量と ATP 量に、統計的な有意差は認められなかった。

以上の結果から、ナイーブマウスの左右のリンパ節の重量と ATP 含量は同等である事が明らかとなった。

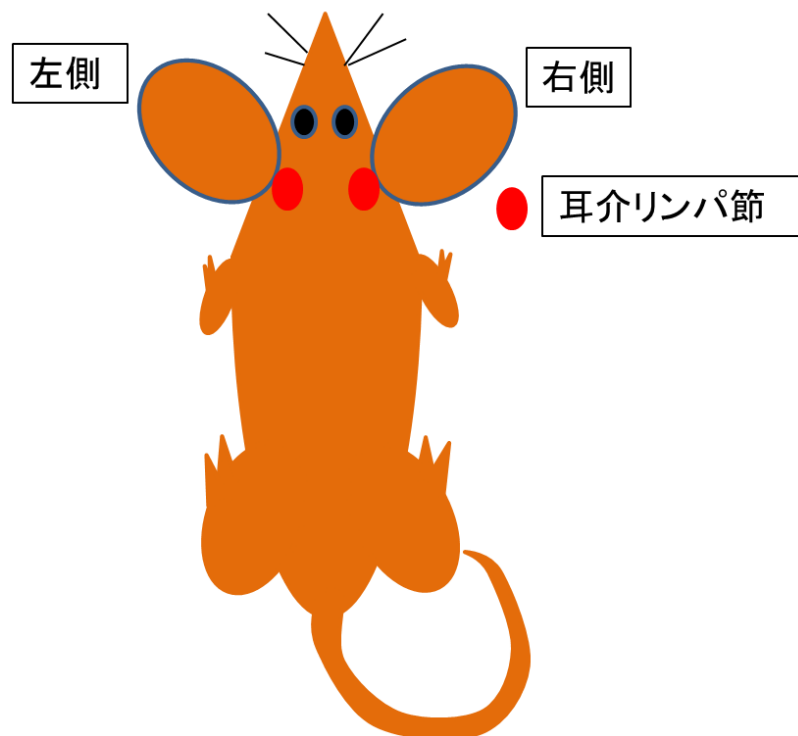


図 7 左右マウスリンパ節の規定

本研究では、マウスを上から見たときを基準に、左右を規定した。

2. 左右のリンパ節の刺激に対する反応性の検討結果

本章1の検討で、CBA/Jマウスの左右耳介リンパ節の相同性が確認されたことから、次に、皮膚刺激性ならびに感作性を有する化学物質暴露に対する、短期の刺激反応性について検討した。本検討は、2群（各群5匹）のマウスを用いて検討を行った。第1群は右側の耳介のみに、AOO溶媒に25%濃度(volume/volume (v/v))になるように溶解したHexyl cinnamic aldehyde(HCA)を塗布し、第2群は左側の耳介のみに、25%HCA / AOOを単回暴露した。暴露48時間後の第1群の右側及び第2群の左側のリンパ節重量は、それぞれ $2.7 \pm 0.3\text{mg}$ 及び $3.1 \pm 0.4\text{mg}$ 、ATP量は、 $21,473 \pm 6,186 \text{ Rlu}$ 及び $25,075 \pm 2,56 \text{ Rlu}$ であった。この時、第1群の右側と第2群の左側の耳介リンパ節重量及びATP量に統計的な有意差は認められなかった。

この結果は、25%HCA / AOOの耳介への暴露によって48時間目に誘導される、左右のリンパ節の増殖が同等であることを示している。

本章1及び、2の結果から、試験に用いたCBA/Jマウスの左右リンパ節は、ナイーブ状態並びに、化学物質暴露に対する短期の刺激反応性においても同等であることが示唆された。

3. 左右のリンパ節の独立性の検討結果

マウスの左右耳介に、皮膚刺激性もしくは皮膚感作を有する 4 種類の化学物質を暴露した結果を図 8 に示した。本検討で用いた化学物質と、試験条件を表 1 に示した。試験濃度は、十分な刺激を引き起こすことが期待される濃度を用い、投与は 1、2、3、10 日目に行い 12 日目に左右のリンパ節を摘出した。その結果、右耳のリンパ節重量は、HCA を暴露した場合の 6mg から 2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB) を暴露した場合の 16mg 程度まで増加した。一方左耳のリンパ節重量は、ナীবマウスと同等であった。また、右側リンパ節の ATP 量にもリンパ節重量に準じた増加が認められたが、左側は増加が認められなかった。

本検討の結果、右側耳介への 4 回の化学物質暴露が、左側耳介のリンパ節重量、細胞増殖に明確な影響を与えないことが判明した。

表 1 試験した化学物質、販売元、試験濃度及び試験溶媒

Chemical name	CAS No	Source	Test conc.	Vehicle
2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB)	70-38-4	Nacalai	0.25% (w/v)	AOO
Hexylcinnamic aldehyde (HCA)	101-86-0	Wako	25% (v/v)	AOO
Sodium lauryl sulfate (SLS)	151-21-3	Sigma	10% (w/v)	DMF
Xylene	1330-20-7	Wako	100%	

略語と用語の説明; CAS No.: Chemical Abstracts Service Number, Wako: Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Nacalai: Nacalai Tesque Inc., Sigma: Sigma Chemical Co.

Test conc.: 試験濃度

v/v: volume/volume

w/v: weight/volume

Vehicle; 試験には、AOO と DMF を溶媒に用いた。

AOO : acetone: olive oil (4:1, v/v)

DMF : *N,N*-dimethylformamide

試験濃度と、試験に用いた溶媒は、これまでの論文を参考に選択した。

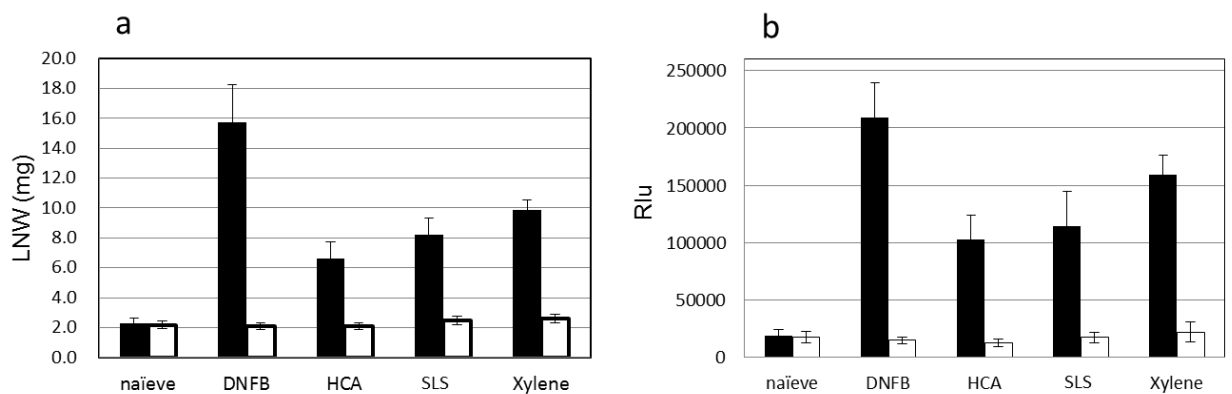


図8 左右耳介リンパ節の独立性

図8の“a”と“b”は、それぞれ、リンパ節重量(LNW)とATP量(Rlu)を示す。

各群のマウスに、DNFB (0.25%)、HCA (25%)、SLS (10%)、Xylene (100%) を1、2、3、10日目に右耳のみに投与し、12日目にリンパ節を摘出し、リンパ節重量とATP量を測定した。

縦軸の黒と白のカラムは、それぞれ、右耳(黒)と左耳(白)を示す。

(本図8は、The Journal Toxicological Science, 2014, Vol39, No.1に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

本章1、2及び3の検討の結果、CBA/Jマウスの左右リンパ節について、①ナイーブの状態に差が無く、②刺激に対する反応性にも差が無く、③右耳への刺激性或いは感作性物質の4回の投与により、左側耳介リンパ節の有意な増加が引き起こされないことが明らかとなった。

4. 惹起相を導入した新規 LLNA 法の試験スケジュールの検討結果

惹起相を導入した新規 LLNA 法の試験スケジュールを確立するために、図 9 に示した 4 群のマウスを用いて、25%HCA 投与に対するリンパ節の増殖反応を測定した。

結果を図 10 の a 及び b に示した。

各群の結果を以下に示す。

第 1 群 (First group) : 右耳耳介への 3 回の 25%HCA 暴露により、右側リンパ節重量が約 3.1mg に増加した。一方左側リンパ節重量は 2.1mg であり、これは、本章 1 の検討結果に示したナイーブマウスと同等であった(図 10 a)。

第 2 群 (Second group) : 左耳耳介への 25%HCA 単回暴露により、左側リンパ節重量が約 2.9mg に増加した。これは、本章 2 の検討結果に示した単回暴露のデータと同等であった。即ち、本単回暴露による増加は、定量的に再現性が確認された(図 10 a)。

第 3 群 (Third group) : 右耳耳介への 3 回の 25%HCA 暴露により、右側リンパ節重量が約 3.5mg に増加した。左側への単回暴露により、左側リンパ節は 4.3mg に増加した(図 10 a)。

第 4 群 (Fourth group) : 右耳耳介への 4 回の 25%HCA 暴露により、右側リンパ節重量が約 6.7mg に増加した。左側への単回暴露により、左側リンパ節は 4.0mg に増加した(図 10 a)。

第 3 群 (Third group) と第 2 群 (Second group) の左側リンパ節重量の比較結果から、右側に 25%HCA を 3 回暴露したマウスの左耳に単回暴露した場合、第 2 群で示した単回暴露以上のリンパ節重量の増加が生じることが明らかとなった(図 10 a)。

第 1 群 (First group) の結果から、右耳耳介への 3 回の 25%HCA 暴露が、左側リンパ節

に増殖を引き起こさないことも明らかであるから、この第 3 群 (Third group) と第 2 群 (Second group) の左側リンパ節重量の差は、第 3 群では、右耳への 3 回暴露により感作が起こり、左耳耳介リンパ節に惹起反応、即ち単純な刺激以上の増殖が生じたと考えられた。

第 4 群 (Fourth group) と第 3 群 (Third group) の左耳リンパ節重量を比較した結果、リンパ節重量に有意な差は認められなかった。これは、右耳への 4 回目の投与が左側の惹起反応に影響を与えないことを示している。

一方第 4 群 (Fourth group) と第 3 群 (Third group) の右側リンパ節重量を比較した場合、右側リンパ節重量は、4 回目の暴露により約 3mg 増加した。25%HCA の単回暴露によるリンパ節の増加は、第 2 群 (Second group) の結果からは約 0.5mg であるから、この結果は、右側にも左側耳介と独立した惹起反応が生じていることを示した。

以上示したリンパ節重量における 4 群間の相関は、図 10 b に示した ATP 量でも同様に確認された。

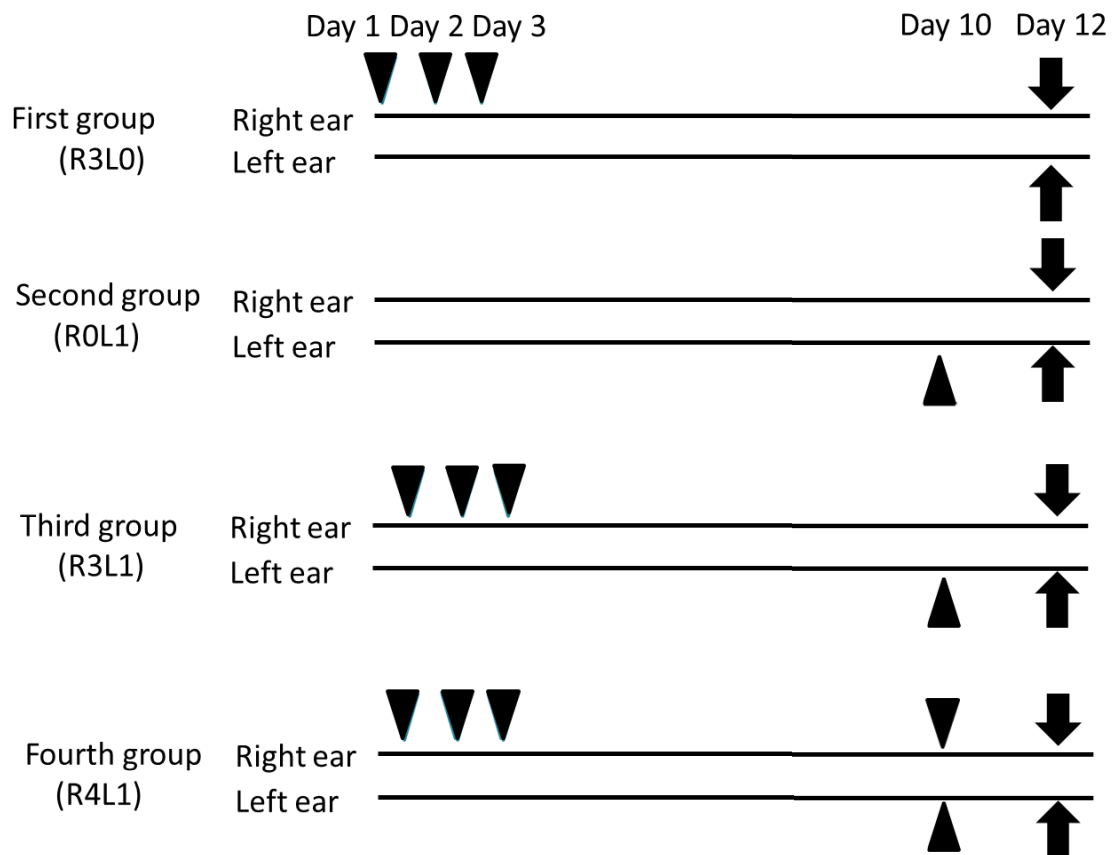


図9 試験プロトコール決定のために検討したスケジュール

▲ は、25 μ L の HCA (25%) の投与を示す。

↑ は、リンパ節の摘出を示す。

R4L1 は、右耳に 3 回、左耳に 1 回の投与を行ったことを示す。R の右側の数値は、右耳耳介への投与回数、L の右側の数値は、左耳耳介への投与回数を示す。

(本図 9 は、The Journal Toxicological Science, 2014, Vol39, No.1 に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

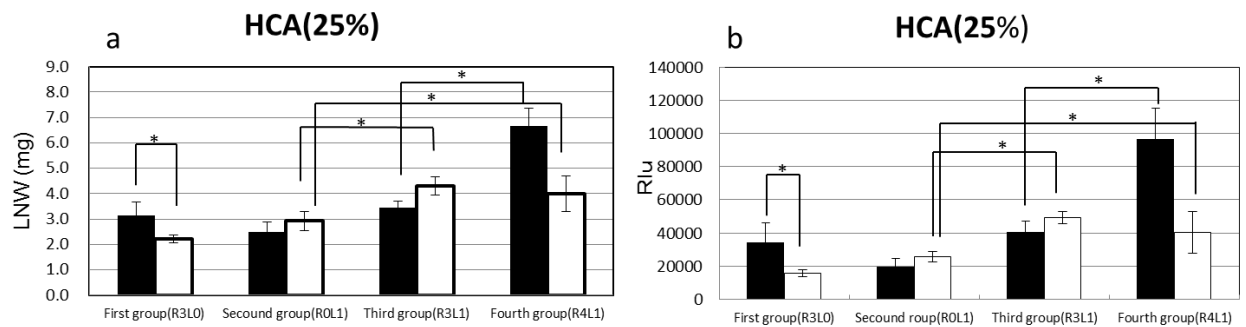


図 10 HCA を用いた試験スケジュールの検討

図 “a” と “b” は、それぞれ異なる試験スケジュールで、25%HCA を投与したマウスのリンパ節重量と、ATP 量を示す。

First group (R3L0)の結果は、1、2、3 日目に右耳にのみ投与した結果を示す。

Second group (R0L1) の結果は、10 日目に左耳にのみ投与した結果を示す。

Third group (R3L1) の結果は、1、2、3 日目に右耳に投与し、10 日目に左耳に投与した結果を示す。

Fourth group (R4L1) の結果は、1、2、3 日目に右耳に投与し、10 日目に両耳に投与した結果を示す。

いずれの群においても、リンパ節重量、ATP 量の測定は、12 日目に行った。縦軸の黒と白のカラムは、それぞれ、右耳（黒）と左耳（白）を示す。

それぞれのカラムは、平均± 標準偏差を示す (n = 5)。

X 軸は、試験スケジュールを示し、Y 軸は、リンパ節重量(図 a)と ATP 量(図 b)を示した。

* は、Student's *t*test において、 $P < 0.05$ であることを示す。

(本図 10 は、The Journal Toxicological Science, 2014, Vol39, No.1 に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

5. 惹起反応における感作濃度の検討結果

新規 LLNA 法の惹起反応における感作濃度の影響について、2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)を用いて検討した結果を図 11 の a 及び b に示した。

感作濃度(w/v)を、0.06%, 0.13%, 0.25% と増加させ、惹起を 0.25%で行った結果、各暴露群の右側リンパ節重量はコントロール群と比較して、それぞれ、2.5mg,4.7mg 及び 8.8mg 増加した(図 11 a)。一方左側リンパ節重量は、それぞれ、0.9mg,1.9mg 及び 3.4mg 増加した。この時の、感作濃度 0.1%当たりの左側リンパ節重量の計算値は、いずれも、 $1.5\text{mg} \pm 0.1\text{mg}$ であり、感作濃度に依存した惹起反応が生じていることが示唆された。本関係は、図 11 b に示した ATP 量でも認められ、感作 0.1%当たりの左側リンパ節の ATP の増加量は、いずれも、 $19,577 \pm 4,099\text{Rlu}$ であった。

本検討結果は、マウスの左右耳介を用いて、惹起反応を指標に定量的な皮膚感作性評価が出来る可能性を示唆する結果である。

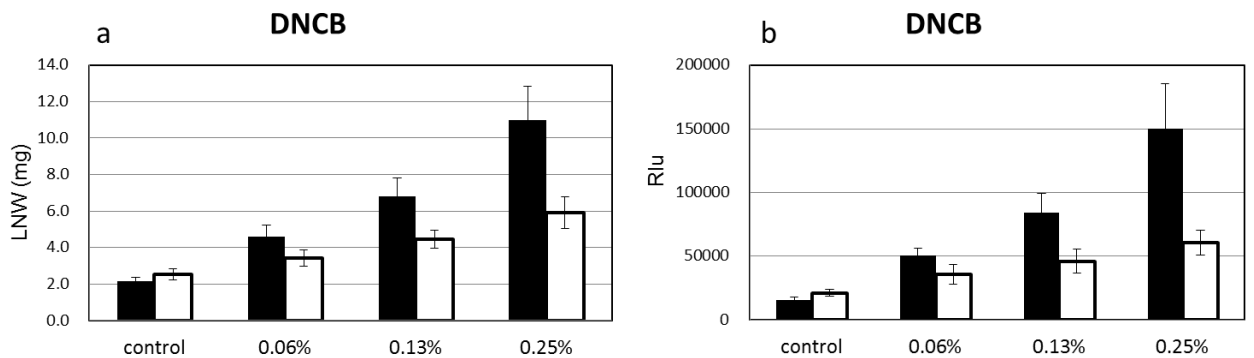


図 11 惹起反応における感作濃度の検討

図 11 “a” と “b” は、異なる感作濃度で DNCB を投与し、0.25% の DNCB で惹起を行ったマウスそれぞれのリンパ節重量(a)と、ATP 量(b)を示す。

各群のマウスの右耳に、それぞれ 0.06%, 0.13%, or 0.25% DNCB を 1、2、3 日目に右耳に投与し 10 日目に両耳に 0.25% DNCB を投与した。コントロールグループは、10 日目にのみ左耳に 0.25% DNCB を投与した。

いずれの群においても、リンパ節重量と、ATP 量の測定は、12 日目に行った。縦軸の黒と白のカラムは、それぞれ、右耳（黒）と左耳（白）を示す。

それぞれのカラムは、平均±標準偏差を示す (n = 5)。

X 軸は、右耳に投与した DNCB 濃度を示し、Y 軸は、リンパ節重量(a)と ATP 量(b)を示した。

(本図 11 は、The Journal Toxicological Science, 2014, Vol39, No.1 に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

考察

マウスにおいて、惹起反応を検出する試験法の開発を目標に研究を行った。マウスを用いて惹起反応を検出する手法には、序論に述べた MEST 法以外に、Ulrich、Ezendam や我々の研究室で行われた先行研究がある⁵²⁻⁵⁴。しかしながら、これらの報告では、左右耳介の相同性、反応性などに関し十分な報告がされておらず、また評価事例もそれぞれ 2 から 4 物質であり試験法として十分な検証がされているとは言えない。そこで、本目標を達成するために、第一段階として CBA/J マウスの耳介リンパ節の相同性及び反応性に関する検討を行った。

11 週齢のナイーブマウスの左右のリンパ節重量について検討した結果、左右のリンパ節重量及び ATP 量に統計的な有意差は認められなかった。通常 LLNA 法は、8 週齢から 9 週齢のマウスを用いて開始することから、8 週齢のマウスについても検討した。その結果、左右差と共に、週齢間の差も認められなかった(data not shown)。この結果は、約 4 週間にわたり、ナイーブマウスの左右のリンパ節の重量と ATP 含量は同等であることを示し、左右の耳介リンパ節が、惹起反応の検出に使用できる可能性を確認した。

一方、ナイーブな状態の左右のリンパ節に量的な差が無くとも、感作性物質や刺激性物質の暴露に対する反応性が異なれば、惹起反応の検出に使用できない可能性がある。そこで別の動物群のそれぞれ右側、左側の耳介に、25%HCA/AOO を単回暴露し 48 時間後のリンパ節重量と ATP 量を測定した結果、リンパ節の増殖の程度に差はなかった。この結果は、感作性物質の単回暴露によって引き起こされる 48 時間以内のリンパ節増殖に左右差が無いことを示している。マウスの耳介リンパ節の重量や、刺激への反応性は、マウスの系統により異なっていることが知られており、本知見は、CBA/J マウスの左右耳介に関する重要な基礎的知見であると考えられる。

惹起相を導入した新規 LLNA 法を開発するに当たり、MEST 法等を参考に、感作から惹起までの試験期間として最大 2 週間を想定した。また暴露回数は、LLNA:DA 法等の開発経験から感作 3 回、惹起 1 回の 4 回を想定した。この場合、感作に用いる片耳耳介への化学物質の投与により、同一個体の反対側リンパ節が、惹起処置前に増殖すれば、左右の耳介を、

感作と惹起に使い分けると言う試験原理が成立しない。LLNA法で有意なリンパ節増殖を引き起こすことが明らかな化学物質を右耳耳介に4回投与した結果、右側のリンパ節重量はおよそ6mgから16mg程度まで増加したが、左側のリンパ節重量は、ナイーブマウスと同等であった(図8)。また、右側リンパ節のATP量も、リンパ節重量に準じた増加が認められたが、左側には増加は認められなかった。即ち、右耳耳介への4回の化学物質暴露は、左側の耳介リンパ節重量に影響を与えないことが明らかとなった。

金森らの報告によれば、感作性化学物質に暴露されたマウスにおいて、暴露後数日以内に非特異的なリンパ球の増殖が起こり、その後に特異的なリンパ球が発生すると報告されている。更にその特異的な、おそらく全身に循環するメモリーTリンパ球は、血中リンパ球のおよそ0.08%であると報告されている^{55,56)}。この報告は、我々の、右側への感作性或いは刺激性化学物質の4回の投与が、左側リンパ節重量に影響を与えなかったと言う結果と矛盾しないものである。即ち、感作性物質によって感作されたマウスにおいて、感作した右耳耳介と反対側の左耳耳介リンパ節に抗原特異的なリンパ球が循環していたとしても、その量は、最大で左側リンパ節重量の0.08%であり、これは重量レベルで影響を与えないと言うことを意味する。また、金森らの報告は、本章2項目目の25%HCAを用いた検討において観察された48時間後のリンパ節増殖が、感作性あるいは刺激性物質に共通した非特異的な増殖である事も示唆する。

金森らの知見、及び今回得られた結果は、感作誘導相において右側の耳介に化学物質を投与したときに、それが感作性物質であれば、一定期間後には左側リンパ節に、重量レベルでの差は出ないが、特異的なメモリーTリンパ球が存在し、一方それが刺激性物質であった場合には、左側リンパ節はナイーブな状態にあることを示唆する。即ち、惹起相において、感作性物質であった場合には、左側リンパ節では、暴露初期に起こる非特異的な増殖と共に、メモリーTリンパ球による特異的なリンパ球の増殖も生じ、一方純粋な刺激性物質であった場合には、非特異的な増殖のみが生じることになる。従って、惹起相においてその違いが検出できれば、惹起相を利用する新規な感試性試験法の確立が可能であると考えた。

HCA を用いた試験スケジュールの検討を行ったリンパ節重量の結果を図 10-a に示した。右耳耳介への 3 回の 25% HCA 暴露により、第 1 群の右側リンパ節重量が約 3.1mg に増加した。また、左側耳介への 25% HCA 単回暴露により、第 2 群の左側リンパ節重量が約 2.9mg に増加した。これは、本章の検討 2 の結果に示した単回暴露のデータと同等であった。即ち、単回暴露による増加に、定量的な再現性が確認された。一方、右耳への 3 回の感作により増加したリンパ節重量と左耳への単回暴露でのリンパ節重量が同程度であったことから、本結果からは、右側のリンパ節重量から感作性を判断することは困難であると考えた。HCA は、EC3 値が 10% 程度の弱い感作性物質である。このことは、より弱い感作性物質を評価した場合に、3 回の投与では感作が十分生じているか否か、右側のリンパ節重量から評価できない可能性が考えられた。

第 3 群と第 4 群の左側リンパ節重量に差は認められなかった。これは、右耳への 4 回目の投与が左側の惹起反応に影響を与えないことを示している。右側リンパ節重量を比較した場合、右側リンパ節重量は、4 回目の暴露により、3 回の感作処置に比べ、約 3mg 増加した。既に、本章 3 項目目の結果で示したが、右耳への 4 回の化学物質暴露が、左側リンパ節の重量に影響を与えないことが確認されていることから、右側のリンパ節の重量増加を感作成立の指標に用いる事を考え、本試験法における右耳への感作処置は 4 回とする事とした。以上の結果、試験スケジュールは、図 9 の第 4 群 (Fourth group) に示した手法に決定した。

本試験法は、試験物質が感作性物質ならば、感作段階で右側リンパ節で増殖した感作性物質特異的リンパ球が左側リンパ節に循環し、惹起投与により誘導されるリンパ節増殖において刺激性物質とは差が生じる、と言う仮説に基付いている。この仮説が正しいとすれば、感作性物質の濃度依存的に特異的リンパ球の循環量に差が生じ、同じ濃度で惹起したときに、感作濃度に依存して惹起反応に差が出るはずである。これを検証した結果を図 11 に示した。感作濃度を、0.06%, 0.13%, 0.25% とし、0.25% の同じ濃度で惹起した場合、左側リンパ節重量は、0.25% の単回暴露により生じるリンパ節重量に比べ、それぞれ 0.9mg, 1.9mg 及び 3.4mg 増加した。この時の、感作 0.1% 当たりのリンパ節重量の増加量は、いずれも、 $1.5\text{mg} \pm 0.1\text{mg}$

であった。この結果は、感作濃度に依存した感作性物質特異的リンパ球の左側リンパ節への循環が生じていることを示唆し、本試験の仮説が正しいことを示す結果であると考えられる。

第三章 新規 LLNA:DAE 法の有効性の施設内検証

本章における検討の背景と課題

第二章で、化学物質投与による、惹起反応としてのマウスのリンパ節重量の増加を指標とする、新規皮膚感作性試験法の可能性が示唆された。以後本新規試験法を、LLNA:DAE 法とする。LLNA:DAE 法は、試験は図 12-a に示した試験群及びコントロール群の 2 群の動物を用いて行い、両群の左耳のリンパ節重量に統計的な差が認められた場合に惹起反応陽性、即ち皮膚感作性陽性とする事とした。従来標準法である LLNA:DAE 法と LLNA:DAE 法の違いを明確にするために、両試験法の比較を図 12-b に示した。図 12-b に示したように、LLNA:DA 法ではマウスの両耳介を区別せずに用いているのに対し、LLNA:DAE 法では、刺激反応と惹起反応を区別して検出するために、マウスの左右の耳介を区別して活用している。更に、LLNA が刺激と感差を区別するために、ATP 取り込み量を基準としたカットオフ値を判定に用いているのに対し、LLNA:DAE 法では、刺激の影響を受けないために、リンパ節重量の差を判定基準に用いているのが大きな違いである。

第三章では、LLNA:DAE 法の新規皮膚感作性試験法としての可能性を、以下の二つの項目について 24 種類の化学物質を用いて検証した。

1. 極度の感作性物質から、弱い感作性物質、更に感作性を有さない物質を LLNA:DAE 法を用いて評価し、試験結果を LLNA 法及び LLNA:DA 法と比較し検証する。
2. LLNA:DA 法において、序論で述べた境界域陽性の結果を与えた試験物質が正確に識別できるか検証する。

以上の 2 点である。

これらの項目を検証した理由を以下に述べる。

まず 1 番目の項目について、新規試験法を開発するためには、新規試験法の結果が、OECD 等により公的にバリデートされた既存の試験法の結果と一致することが重視される。LLNA 法の改良法である LLNA:DAE 法においては、LLNA 法の結果との一致率が重要になる。こ

の点に関し、OECD TG429 では、新規 LLNA 法の代替法を開発する際の Performance Standard (PS) として 18 種類をミニマムセットとして設定している。更にこの 18 種に加えて、LLNA 法において改善が望まれる 4 種の化学物質をオプション化合物として設定している。これらは、極度の感作性物質から、弱い感作性物質、更に感作性を有さない物質を含み、新規な LLNA 法を開発する場合には、その試験法の有効性を検証するのに適すると推奨される物質である。これらについては、TG429 より表 2 に転載した。

即ち、LLNA:DAE 法の有効性を検討するには、これらの物質を評価することが重要となる。本研究では、OECD TG429 の PS に記載されている物質を中心に極度感作性物質 4 種 (5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one, 2,4-Dinitrochlorobenzene, 2,4-Dinitrofluorobenzene 及び p-Benzoquinone)、強度感作性物質 3 種 (p-Phenylenediamine, Cobalt chloraide 及び Hydroquinone)、中程度感作性物質 2 種 (Isoeugenol 及び 2-Mecaptobenzothiazole)、弱感作性物質 8 種 (Citral, Hexylcinnamic aldehyde, Eugenol, Cinnamic alcohol, Phenyl benzoate, Imidazolidinyl urea, Methyl methacrylate 及び Ethylene glycol dimethacrylate)、非感作性物質 6 種 (Chlorobenzene, Isopropanol, Lactic acid, Methyl salicylate, Salicylic acid 及び n-Hexane)、及び LLNA 法において、ヒトの結果と比較した場合に偽陰性の結果を与える Nickel chloride (NiCl₂) を選択した。TG429 の PS においては、極度感作性物質として、5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one CMI/ 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (MI) が規定されているが、国内での入手が困難であったため、これに代えて同じく極度の感作性物質である CMI を用いた⁵⁸⁾。これ以外の 17 種については全て含めた。DNFB、p-Benzoquinone (BQ) 及び Hydroquinone (HQ) は、PS に含まれないが、第六章で述べる交差感作性評価のために評価物質に加えた。試験濃度に関しては、第二章の HCA を用いた検討において、LLNA 法で求められた EC3 値以上の濃度において惹起反応が期待できることが示唆されたため、TG429 の PS に記載された既知の EC3 に関する情報を基に設定した。特に、Methyl methacrylate などの弱感作性物質などにおいては、概ね既報の EC3 値に近い濃度を用いて試験を行った。これらの物質を評価することで、LLNA:DAE 法の新規皮膚感作性試験法としての有効性を検証した。

次に2番目の項目について述べる。LLNA:DA法がOECDに収載される際に、LLNA法には無い境界域陽性領域が設定された。我々の、LLNA:DA法に関するバリデーション研究の結果を元にInteragency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) が解析した結果、データ解析した44物質の内、LLNA法で陽性とされる32物質の内27物質は全ての評価結果においてSI値2.5以上を示した²⁵⁾。一方LLNA法で陰性とされる12物質の内、8つの物質は全ての評価結果においてSI値1.8未満であった。残る9物質は、LLNA法の試験結果は陽性であるが、ICCVAMの報告書からデータを引用し作成した表3に示したように、SI値が2.5未満の結果を示す場合があり、また逆にLLNA法の試験結果は陰性であるが、SI値が1.8以上の結果を示す場合があった。

これら境界域の結果が生じる理由については以下の2つが考えられる。第一に物質の特異性もしくは試験手技による影響である。例えば、バリデーション研究において、境界域陽性の結果を示す場合があったCobalt chlorideなどは、各試験結果によるSI値の範囲が、2.01～20.55と非常にばらつきが大きいことが示されている。また、もう一つの理由として、LLNA法において、化学物質の皮膚刺激性とリンパ節の増殖に相関がある事が知られており⁵⁷⁾、これにより、境界域の結果が出る場合があると考えている。例えばChlorobenzeneは、GPMT及びLLNA法では陰性であるが、LLNA:DA法では、2.44のSI値を与えた²⁶⁾。

LLNA:DA法が記載されたガイドラインである、OECD TG 442Aでは、これらの結果が出た場合には、他の物質との構造類似性、データの統計的処理などによって、陽性と判定することが記載されているが、これらの具体的手法については記載されていない²⁶⁾。

非感作性物質が、境界域陽性の結果を与える原因の一因が、皮膚刺激性による非特異的なリンパ節増殖にあるならば、惹起相を導入したLLNA:DAE法によって、感作性と刺激性の識別が可能であると考えられた。そこで、本検討では、境界域の結果を示した物質から7つを選び評価した。即ち、本章の二つ目の目的は、LLNA:DA法で境界域陽性の結果が出た場合に、LLNA:DAE法を用いることで、皮膚感作性物質か皮膚刺激性物質かを識別できるかを検証することである。

本章では、24 種類の化学物質を用いて、上述した2つの課題について検討し、新規皮膚感作性試験法としてのLLNA:DAE法の有効性を検証した。

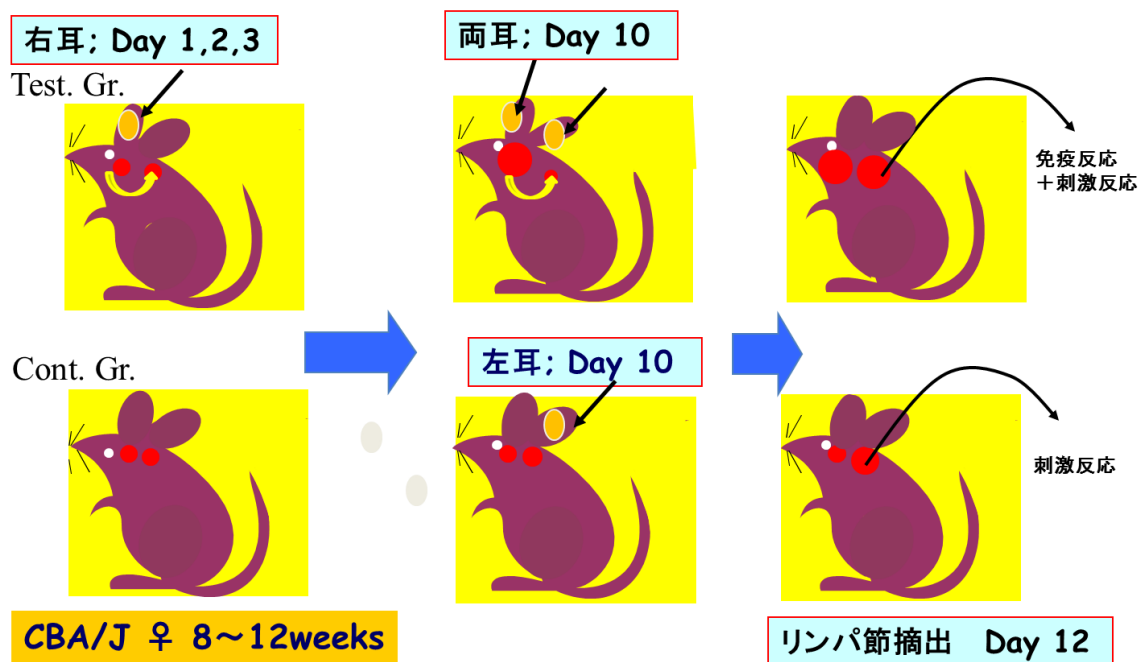
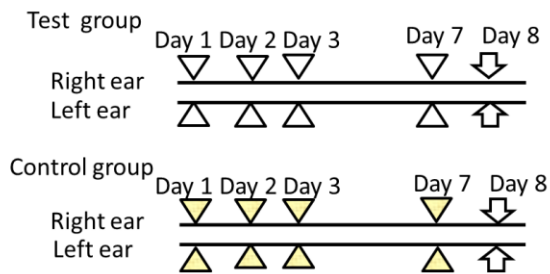


図 12-a LLNA:DAE 法の概略

試験群のマウス(1群5匹)の右耳に、試験物質を1、2、3日目に投与し、10日目に両耳に投与する。コントロール群のマウス(1群5匹)には、10日目のみに左耳に試験物質を投与する。いずれの群も12日目にリンパ節を摘出し、リンパ節重量を測定する。

本法においては、最終投与の48時間後に摘出するため、コントロール群においては、刺激性に起因する増殖のみが起こると考えられる。一方、試験群では、仮に試験物質が感作性物質であれば、感作誘導された特異的リンパ球の増殖と、刺激による増殖の両者が起こることが期待される。即ち、LLNA:DAE法では、その差の有無を感作性の指標とし、統計的有意差があれば感作性陽性とする。

LLNA:DA法の試験プロトコール



LLNA:DAE法の試験プロトコール

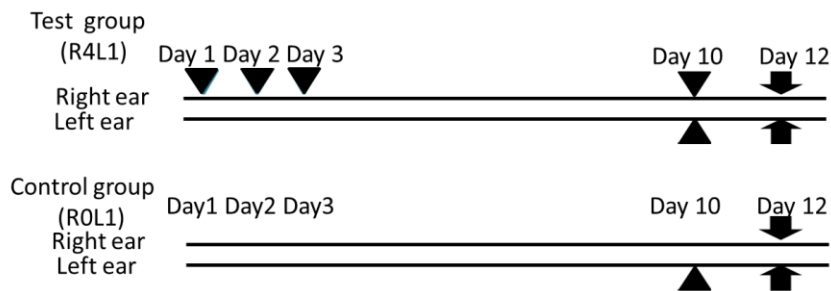


図 12-b LLNA:DA 法と LLNA:DAE 法の比較

LLNA:DA 法においては、試験群のマウスの両耳に、1、2、3、7 日目に試験物質を投与する。試験物質の投与 1 時間前に 1%SLS 溶液を塗布する。そして 8 日目リンパ節を摘出し、ATP 量を測定する。コントロール群は、1%SLS 塗布及び溶媒の投与を行う。陽性の判定は、試験群の ATP 量が、コントロール群の 1.8 倍になったときに感差性陽性を判定する。

LLNA:DAE 法との違いは、LLNA:DA 法が、両耳に同じ投与スケジュールで投与を行い、最終投与の 24 時間後に評価のために、リンパ節を摘出し ATP 量を測定するのに対し、LLNA:DAE 法では、両耳に異なる投与スケジュールで投与を行い、最終投与の 48 時間後にリンパ節を摘出し、重量を測定することである。陽性の判定は、試験群の左耳のリンパ節重量が、コントロール群の左耳のリンパ節重量より、統計的に優位に増加した場合に陽性と判定する。

- △ SLS 塗布及び試験物質塗布、 ▲ SLS 塗布及び溶媒塗布、 ↑ リンパ節摘出及び ATP 測定、
- ▲ 試験物質塗布、 ↑ リンパ節摘出及びリンパ節重量測定

表 2 OECD TG429 に記載されている PS table

429

OECD/OCDE

TABLE 1: RECOMMENDED REFERENCE SUBSTANCES FOR THE LLNA PS.

Number	Substance ¹	CAS No	Form	Veh ²	EC3 % ³	N ⁴	0.5x - 2.0x EC3	Actual EC3 Range	LLNA vs. GP	LLNA vs. Human
1	5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one (CMI)/ 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (MI) ⁵	26172-55-4/ 2682-20-4	Liq	DMF	0.009	1	0.0045-0.018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol	AOO	0.049	15	0.025-0.099	0.02-0.094	+/+	+/+
3	4-Phenylenediamine	106-50-3	Sol	AOO	0.11	6	0.055-0.22	0.07-0.16	+/+	+/+
4	Cobalt chloride	7646-79-9	Sol	DMSO	0.6	2	0.3-1.2	0.4-0.8	+/+	+/+
5	Isoeugenol	97-54-1	Liq	AOO	1.5	47	0.77-3.1	0.5-3.3	+/+	+/+
6	2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	Sol	DMF	1.7	1	0.85-3.4	NC	+/+	+/+
7	Citral	5392-40-5	Liq	AOO	9.2	6	4.6-18.3	5.1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Liq	AOO	9.7	21	4.8-19.5	4.4-14.7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Liq	AOO	10.1	11	5.05-20.2	4.9-15	+/+	+/+
10	Phenyl benzoate	93-99-2	Sol	AOO	13.6	3	6.8-27.2	1.2-20	+/+	+/+
11	Cinnamic alcohol	104-54-1	Sol	AOO	21	1	10.5-42	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidinyl urea	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Methyl methacrylate	80-62-6	Liq	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Chlorobenzene	108-90-7	Liq	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/*
15	Isopropanol	67-63-0	Liq	AOO	50	1	NA	NA	-/-	-/*
16	Lactic acid	50-21-5	Liq	DMSO	25	1	NA	NA	-/-	-/*
17	Methyl salicylate	119-36-8	Liq	AOO	20	9	NA	NA	-/-	-/-
18	Salicylic acid	69-72-7	Sol	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/-

OECD/OCDE

429

Number	Substance ¹	CAS No	Form	Veh ²	EC3 % ³	N ⁴	0.5x - 2.0x EC3	Actual EC3 Range	LLNA vs. GP	LLNA vs. Human
Optional Substances to Demonstrate Improved Performance Relative to the LLNA										
19	Sodium lauryl sulfate	151-21-3	Sol	DMF	8.1	5	4.05-16.2	1.5-17.1	+/-	+/-
20	Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	Liq	MEK	28	1	14-56	NC	+/-	+/+
21	Xylene	1330-20-7	Liq	AOO	95.8	1	47.9-100	NC	+/**	+/-
22	Nickel chloride	7718-54-9	Sol	DMSO	5	2	NA	NA	-/+	-/+

Abbreviations: AOO = acetone: olive oil (4:1, v/v); CAS No = Chemical Abstracts Service Number; DMF = *N,N*-dimethylformamide; DMSO = dimethyl sulfoxide; DNCB = 2,4-dinitrochlorobenzene; EC3 = estimated concentration needed to produce a stimulation index of 3; GP = guinea pig test result (*i.e.* TG 406) (13); HCA = hexyl cinnamic aldehyde; Liq = liquid; LLNA = murine local lymph node assay result (*i.e.* TG 429) (1); MEK = methyl ethyl ketone; NA = not applicable since stimulation index <3; NC = not calculated since data was obtained from a single study; Sol = solid; Veh = test vehicle.

¹ Test substances should be prepared daily unless stability data demonstrate the acceptability of storage.

² Because of the potential impact of different vehicles on the performance of the LLNA, the recommended vehicle for each reference substance should be used (24)(32).

³ Mean value where more than one EC3 value was available. For negative substances (*i.e.* with stimulation index <3, the highest concentration tested is provided).

⁴ Number of LLNA studies from which data were obtained.

⁵ Commercially available as Kathon CG (CAS No 55965-84-9), which is a 3:1 mixture of CMI and MI. The relative concentrations of each component range from 1.1% to 1.25% (CMI) and 0.3% to 0.45% (MI). The inactive components are magnesium salts (21.5% to 24%) and copper nitrate (0.15% to 0.17%), with the remaining formulation 74% to 77% water. Kathon CG is readily available through Sigma-Aldrich and Rohm and Haas (now Dow Chemical Corporation).

* = Presumed to be a non-sensitizer in humans based on the fact that no clinical patch test results were located, it is not included as a patch test kit allergen, and no case reports of human sensitisation were located.

** = GP data not available.

OECD TG 429 より転載

表 3 LLNA:DA 法において、SI 値のばらつきが認められた化学物質の評価結果
(複数機関の結果を含む分析結果)

Chemical name	SI
2-Mercaptobenzothiazole	2
Chlorobenzene	2.44
Cobalt chloride	2.01 , 2.54, 2.66, 3.64, 4.25, 5.06, 8.07, 20.55
Hexane	2.31
Isopropanol	0.70, 0.76, 0.91, 1.01, 1.08, 1.21, 1.25, 1.45, 1.54, 1.57, 1.97
Methyl methacrylate	1.81
Salicylic acid	2

Datas were cited from ICCVAM report ²⁵⁾.

検討結果

1. 24 種類の化学物質を用いた新規 LLNA:DAE 法の検証結果

今回評価した 24 化学物質の種類、試験条件と LLNA:DAE 法で試験した結果を、それぞれ表 4、図 13 に示した。また、今回得られた結果、並びにこれまで LLNA 法や LLNA:DA 法等で報告されている結果を表 5 にまとめた。

LLNA 法で Weak 以上の陽性と判定されている 17 種類は、LLNA:DAE 法で全て惹起反応を誘導し、感作性物質であると分類された。更に、LLNA 法において、偽陰性の結果を与えるとされる NiCl₂ は LLNA:DAE 法では明確な惹起反応を誘導し、感作性陽性となった。一方 LLNA 法において陰性とされる 6 物質は全て陰性と判定された。

評価した 24 物質には、本章における 2 番目の課題について検証するために、LLNA:DA 法の評価において、境界域陽性に分類される結果を示した物質である、Cobalt chloride, 2-Mercaptbenzothiazole, Methyl methacrylate, Chlorobenzene, Isopropanol, Salicylic acid 及び n-Hexane を含めた。LLNA:DAE 法においては、これらの物質の評価結果は、LLNA 法と一致した。

本章で得られた結果をまとめると、今回試験した 24 物質の内、23 物質の結果は LLNA 法と一致し、その一致率(accuracy)は 96%であった。新規試験法を評価する場合、対象とした標準的試験法に対する一致率は、より高いほうが好ましい。LLNA:DA 法を LLNA 法の代替法とする為に行われたバリデーション研究における accuracy は 91%(SI \geq 1.8 を陽性とした場合)であった。即ち、LLNA:DAE 法は LLNA:DA 法と同等以上の結果を示した。更に LLNA:DA 法で境界域陽性の結果を示した 7 物質は全て LLNA 法と同じ結果に再分類された。

今回の結果は、LLNA:DAE 法が、新規皮膚感作性試験法として有望であることを示す結果であると考えられる。

表 4 試験した化学物質と試験濃度及び使用溶媒

Chemical name	CAS No	Source	Test conc.	Vehicle
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	26172-55-4	AK Scientific	0.05% (v/v)	AOO
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	Wako	0.25% (w/v)	AOO
2,4-Dinitrofluorobenzene	70-38-4	Nacalai	0.25% (w/v)	AOO
p-Benzoquinone	106-51-4	Wako	1% (w/v)	AOO
Hydroquinone	123-31-9	Wako	1% (w/v)	AOO
p-Phenylenediamine	106-50-3	Sigma-Aldrich	2.5% (w/v)	AOO
Cobalt chloride	7646-79-9	Wako	5% (w/v)	DMSO
Isoeugenol	7646-79-9	Wako	10% (v/v)	AOO
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	Wako	25% (w/v)	DMSO
Citral	5392-40-5	Wako	25% (v/v)	AOO
Hexylcinnamic aldehyde	101-86-0	Wako	25% (v/v)	AOO
Eugenol	97-53-0	Wako	50% (v/v)	AOO
Cinnamic alcohol	104-54-1	Kanto	25% (w/v)	AOO
Phenyl benzoate	93-99-2	Wako	10% (w/v)	AOO
Imidazolidinyl urea	39236-46-09	ICN	40% (w/v)	DMF
Methyl methacrylate	80-62-6	Sigma-Aldrich	100%	
Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	Wako	50% (v/v)	MEK
Nickel chloride	7718-54-9	Wako	10% (w/v)	DMSO
Chlorobenzene	108-90-9	Wako	25% (v/v)	AOO
Isopropanol	67-63-0	Wako	50% (v/v)	AOO
Lactic acid	50-21-5	Sigma-Aldrich	25% (v/v)	DMSO
Methyl salicylate	119-36-8	Wako	50% (v/v)	AOO
Salicylic acid	69-72-7	Wako	50% (w/v)	AOO
n-Hexane	110-54-3	Kanto	100%	

略語と用語の説明; CAS No.: Chemical Abstracts Service Number, AK Scientific: AK Scientific, Inc., Wako:和光純薬工業株式会社, Nacalai:株式会社ナカライ, Sigma-Aldrich: Sigma-Aldrich Inc., Kanto:関東化学工業株式会社, ICN: ICN Biomedicals Inc, Sigma: Sigma Chemical Co., Test conc.: 試験濃度 Vehicle; 試験には、AOO と DMF を溶媒に用いた。

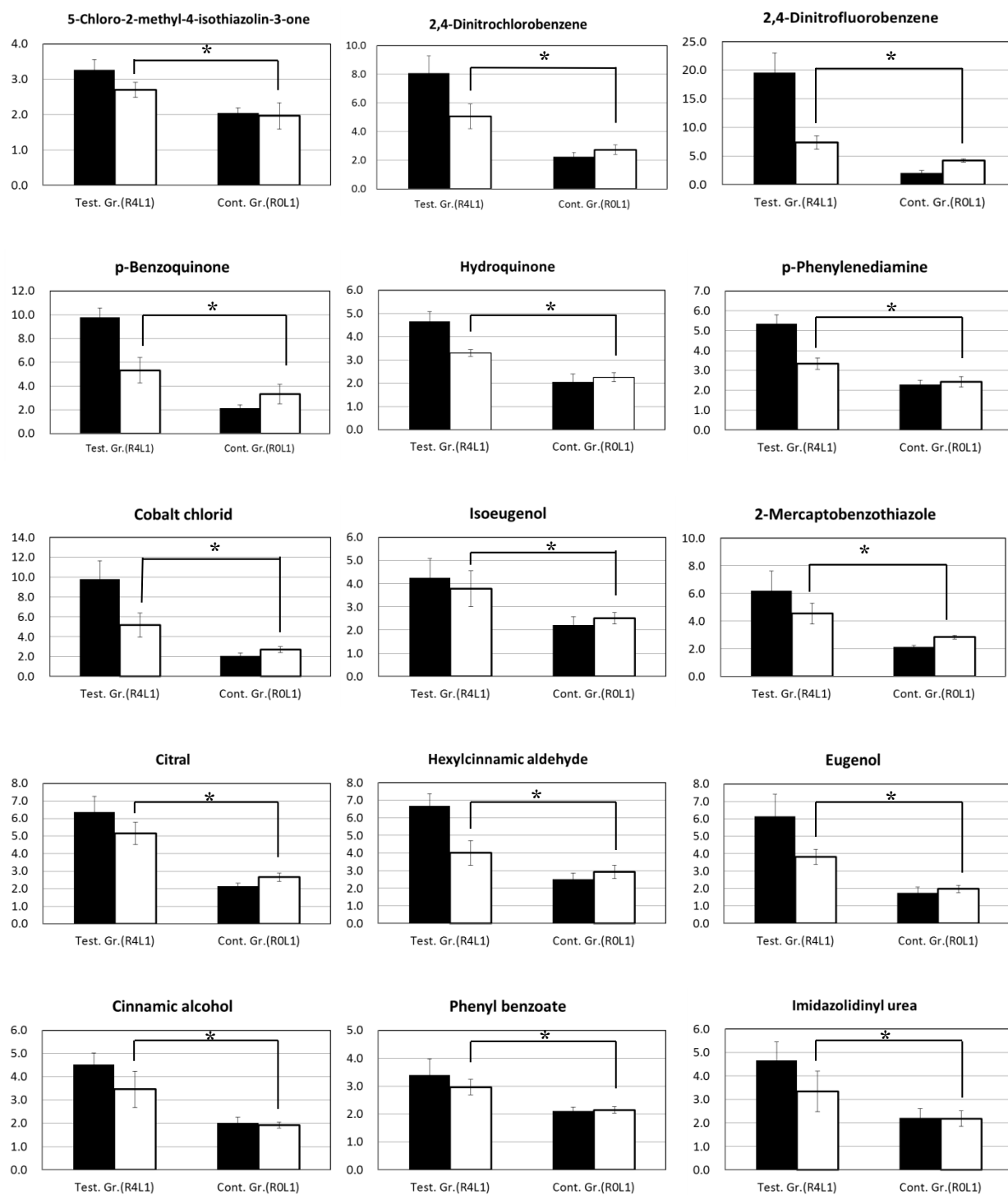
v/v: volume/volume

w/v: weight/volume

AOO: acetone: olive oil (4:1, v/v), DMF: *N,N*-dimethylformamide, DMSO: dimethyl sulfoxide, MEK: methyl ethyl ketone. 試験濃度と、試験に用いた溶媒は、これまでの論文を参考に選択した。

Group A

LNW (mg)



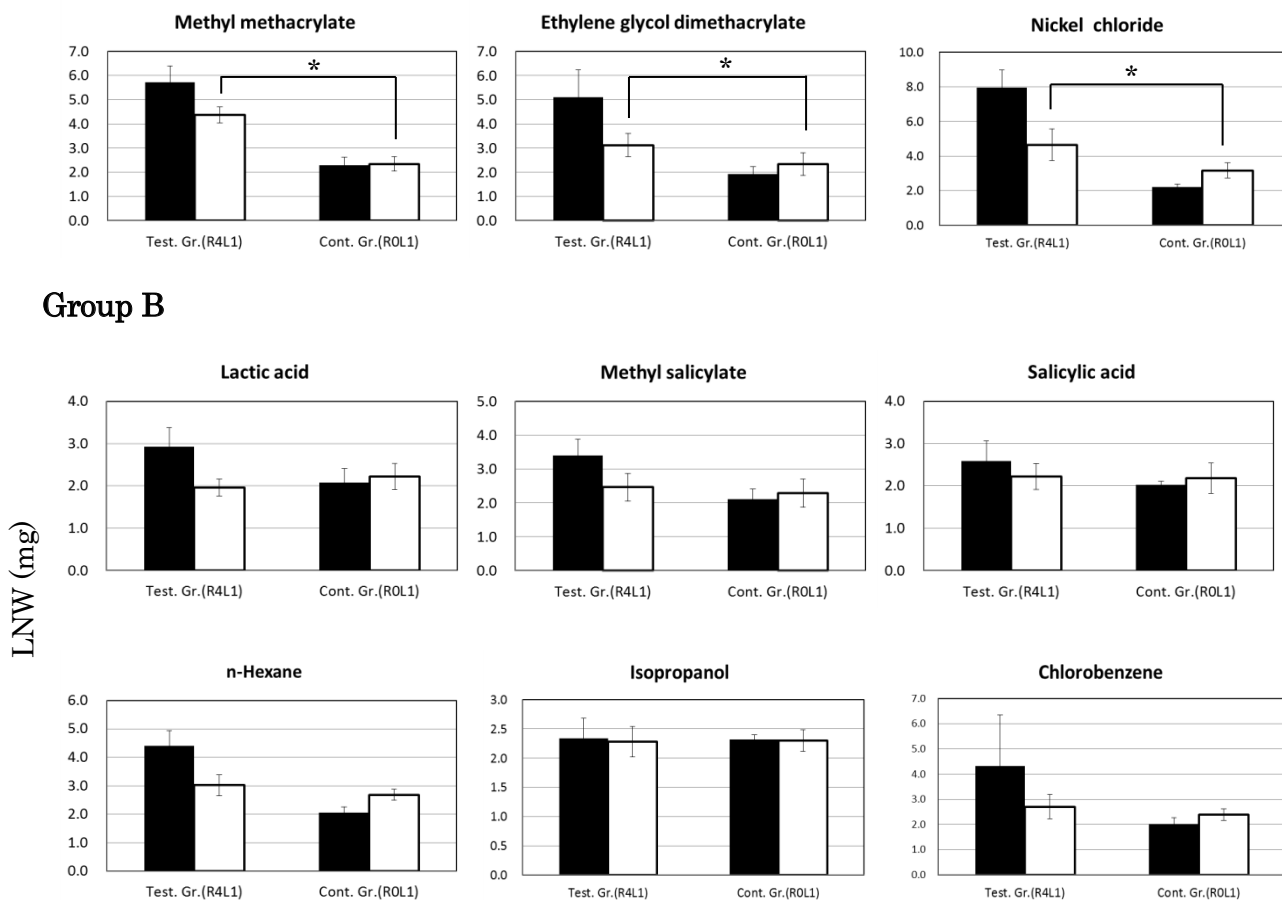


図 13 LLNA:DAE 法による 24 物質の試験結果

惹起反応が認められた化合物、即ち感作性陽性と判定された化合物(Group A)。

惹起反応が認められなかった化合物、即ち感作性陰性と判定された化合物(Group B)。

試験群では、試験物質を、1、2、3 日目に右耳に投与し、10 日目には、両耳に投与した。コントロール群では、10 日目に試験物質を左耳に投与した。12 日目に、全てのマウスのリンパ節を摘出した。紅斑、耳介腫脹、全身毒性は、OECD TG442A の記載に従い評価した。黒カラムは右耳、白カラムは左耳のリンパ節重量を示し、各数値は、平均値±標準偏差(n=5)を示した。X 軸は、各投与群を示し、Y 軸はリンパ節重量を示した。

* は、試験群とコントロール群の左耳のリンパ節重量に、統計的有意差が認められたことを示す。統計学的優位差は、p131 に記載の手法で検定した。

略号：Test Gr.(R4L1)=試験群で、試験物質を右耳に 4 回、左耳に 1 回投与したことを示す。

Cont Gr.(R0L1)=コントロール群で、試験物質を左耳に 1 回投与したことを示す。

(本図 13 は、The Journal Toxicological Science, 2014, Vol39, No.1 に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

表 5 LLNA:DAE 法の試験結果と、他の試験法の結果

Chemical name	LLNA:DAE	LLNA:DA	LLNA potency category	Human
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	+	+ ^a	Extreme ^c	+ ^f
2,4-Dinitrochlorobenzene	+	+ ^a	Extreme ^d	+ ^e
2,4-Dinitrofluorobenzene	+	n.t.	Extreme ^d	+ ^g
p-Benzoquinone	+	+ ^b	Extreme ^d	+ ^h
Hydroquinone	+	n.t.	Strong ^d	+ ^h
p-Phenylenediamine	+	+ ^a	Strong ^d	+ ^e
Cobalt chloride	+	± ^b	Strong ^d	+ ^e
Isoeugenol	+	+ ^a	Moderate ^d	+ ^e
2-Mercaptobenzothiazole	+	± ^b	Moderate ^d	+ ^e
Citral	+	+ ^a	Weak ^d	+ ^e
Hexylcinnamic aldehyde	+	+ ^a	Weak ^d	+ ^e
Eugenol	+	+ ^a	Weak ^d	+ ^e
Cinnamic alcohol	+	+ ^a	Weak ^d	+ ^e
Phenyl benzoate	+	+ ^a	Weak ^d	+ ^e
Imidazolidinyl urea	+	+ ^a	Weak ^d	+ ^e
Methyl methacrylate	+	± ^b	Weak ^d	+ ^e
Ethylene glycol dimethacrylate	+	+ ^a	Weak ^d	+ ^e
Nickel chloride	+	— ^b	— ^e	+ ^e
Chlorobenzene	—	± ^b	— ^d	
Isopropanol	—	± ^b	— ^d	+ ^e
Lactic acid	—	— ^a	— ^d	
Methyl salicylate	—	— ^a	— ^d	— ^e
Salicylic acid	—	± ^b	— ^d	— ^e
n-Hexane	—	± ^b	— ^f	— ^f

略号: LLNA:DAE: local lymph node assay that includes the elicitation phase; LLNA:DA:
LLNA modified by Daicel based on ATP content; LLNA: murine local lymph node assay;+=
陽性; -=陰性; ±=境界域陽性結果; n.t.=試験データなし. Extreme: 極度感作性物質; Strong:
強度感作性物質; Moderate: 中程度感作性物質 Weak: 弱感作性物質.

表に示した LLNA:DA 法の結果は、^aIdehara *et al.* (2008) 等の報告及び^bICCVAM publication
(2010)から引用した。LLNA の感作性強度の分類は、^cGerberik *et al.* (2005), ^dTakenouchi *et al.*
(2013), ^eOECD TG429 (2010b) 及び^fHaneke *et al.* (2001) 等の報告から引用した。ヒトの結
果は、^eOECD TG429 (2010b), ^fHaneke *et al.* (2001), ^gA. Garcia-Perez. (1978) 及び
^hBasketter *et al.* (1999) 等の報告から引用した。

(本表 5 は、The Journal Toxicological Science, 2014, Vol39, No.1 に掲載の自著論文より許可を
得て転載した。)

考察

第二章で、LLNA:DAE 法の基本を確認し、試験スケジュールを決定した。そこで第三章では、新規皮膚感作性試験法としての可能性を、24 種類の化学物質を用いて検証した。

これらを評価するに当たり、試験濃度は概ね LLNA 法の EC3 値に近い値ないしは、EC3 値の 2 倍程度の濃度を用いた。これは、LLNA 法が、EC3 値を含む 3 濃度で試験するのに対し、LLNA:DAE 法が 1 濃度で試験する試験法であるため、EC3 値ないしは、EC3 値の 1 段階高濃度側で陽性判定が得られれば、試験感度として LLNA 法と比較しうると考えたからである。

24 物質を評価した結果、図 13 に示したように、LLNA 法で感作性物質とされる感作性物質 17 種は、全て惹起反応を誘導し感作性物質であると分類された。更に、LLNA 法において、偽陰性の結果を与えるとされる NiCl₂ も惹起反応を誘導し、感作性陽性となった。

LLNA 法で陰性と判定された NiCl₂ が、LLNA:DA 法で陽性となった理由は次のように考えられる。NiCl₂ を LLNA 法で評価した Basketter らの報告によれば、NiCl₂ を DMSO を溶媒として用いて評価した時の SI 値は 2.4 であり、陰性であったと報告されている⁵⁹⁾。一方 DMSO は、それ自体でリンパ節の非特異的増殖を誘導することが知られている⁶⁰⁾。図 4 に示したように、LLNA 法における SI 値は、コントロール群のトリチウムチミジンの取り込みに対する試験群のトリチウムチミジンの取り込みの比であるから、LLNA 法の結果は、溶媒の有するリンパ節の非特異的増殖能に影響を受けることになる。一方、LLNA:DAE 法の場合の判定の基準は、試験群とコントロール群の左側リンパ節の重量の差である。この場合、溶媒によるリンパ節の非特異的増殖誘導は、試験群とコントロール群の両群共に引き起こされると考えられることから、判定には影響しないと考えられる。これが、LLNA 法で陰性の結果を与えた NiCl₂ が LLNA:DAE 法で、正しく陽性と判定できた理由であると考えられる。

次に、今回の 24 物質中、Cobalt chloride, 2-Mercaptbenzothiazole, Methyl methacrylate, Chlorobenzene, Isopropanol, Salicylic acid 及び n-Hexane の 7 物質は、LLNA:DA 法において、境界域陽性の結果を与える可能性がある事が報告されている物質である²⁵⁾。これらにつ

いて、Cobalt chloride, 2-Mercaptbenzothiazole, Methyl methacrylate は惹起反応が認められた。一方 Chlorobenzene, Isopropanol, Salicylic acid 及び n-Hexane は惹起反応が認められず、感作性陰性と判定された。これらの分類結果は、LLNA 法の結果と一致した。

LLNA:DA 法の 44 物質の評価データを ICCVAM において解析した結果、皮膚感作性物質である Methyl methacrylate の与えた SI 値は 1.81 であり、また他の全ての感作性物質も 1.8 以上の SI 値であった。一方皮膚感作性を有さない Chlorobenzene, Isopropanol, Salicylic acid, n-Hexane は、それぞれ最大で、2.44、1.97、2.0、2.31 の SI 値を与えた。即ち、LLNA:DAE 法では偽陰性を避けるための閾値として 1.8 が採用された。LLNA:DAE 法では、これら境界域陽性の結果を与えた化合物の結果も LLNA 法の結果と一致した。

既に、上記 NiCl₂ の項目で解説したが、LLNA:DAE 法の場合、試験群とコントロール群の左耳のリンパ節重量の差で感作性を判定する。即ち、図 12-a に示した様に、感作性物質の場合には、試験群の左耳リンパ節には、感作性物質により誘導された特異的リンパ球により引き起こされる増殖と刺激性による増殖の両方が生じると考えられる。一方コントロール群においては、刺激性による増殖のみが生じると考えられる。即ち、LLNA:DAE 法の場合には、化学物質の刺激性に由来するリンパ節の増殖が判定に影響しないと考えられ、これが正確に再分類できた理由であると考えている。

本章の結果は、LLNA:DAE 法が LLNA 法及び、LLNA:DAE 法の有する根本的な課題を解決しうる新規試験法である可能性を示す結果であると考えられる。

第四章 独立した試験法としての LLNA:DAE 法

本章における検討の背景と課題

第三章までに、新規 LLNA:DAE 法が、マウスにおいて惹起反応を用いた新規皮膚感作性試験として有効である可能性が示唆された。しかしながら、第三章までの検討は、試験濃度に関し、LLNA 法及び LLNA:DA 法に関する既知情報を参考に選択していた。

LLNA:DAE 法を新規試験法として確立する場合、この試験濃度の選択は極めて重要である。LLNA:DAE 法は、他の LLNA 法と違い、1 濃度で試験を行う。即ち、濃度依存性を判断することが出来ない。更に感作性の判定を、試験群とコントロール群の片耳のリンパ節重量の統計的有意差で判定するため、1 濃度で確実に惹起反応を検出できる濃度設定が必要である。そして、この試験濃度を決定するのが予備試験である。

これまでガイドライン化された LLNA 法及び LLNA:DA 法における予備試験の概要を以下に述べる。例えば、LLNA 法においては、本試験と同様に 1 日目から 3 日目までの投与を行う。LLNA:DA 法においても、本試験と同様に 1 日目から 3 日目までの投与、及び 7 日目の投与を行う。暴露濃度は、液体は 100%を最高用量に、固体は溶解する上限或いは懸濁状態を最高濃度とし、公比 2~2.5 で 4~5 段階の希釈系列を設定する。ただし、予備試験最終日の評価、即ち LLNA 法においてはリンパ節へのトリチウムチミジンの取り込み、LLNA:DA 法においてはリンパ節の ATP 量の測定は行わない。そして、試験濃度の設定は、予備試験期間中に観察される全身毒性及び皮膚刺激性反応を指標に行う。具体的な指標と最高試験濃度設定の基準は以下のように定められている。即ち、“全身毒性を示さない濃度であり、かつ重篤な皮膚刺激性を示さない最高濃度を最高濃度とする。(重篤な皮膚刺激性とは、スコア 3 以上の紅斑もしくは、25% 以上の耳介厚の増加が生じた場合である。)” なお、本論文において、皮膚の紅斑の判定は、OECD TG 442 に記載された基準に従い、紅斑なし=0、ごく軽度の紅斑（かろうじて識別できる）=1、はっきりした紅斑=2、中等度から重度の紅斑=3、重度の紅斑（ビート様の色）から紅斑の採点ができないほどの痂皮形成=4 の 5 段階で行った。

本章では、LLNA:DAE 法を独立した試験法として確立するために、従来の LLNA 法で行われている予備試験を参考に、新規に LLNA:DAE 法に最適化した予備試験方法並びに本試験濃度の選択手法の確立を目的に検討を行った。

この目的の達成のため、本章においては次の 5 つの検討を行った。

1. HCA を用いた予備試験に用いる動物数に関する検討
2. Isoeugenol (IEU) 及び DNCB を用いた予備試験に関するモデル検討
3. 惹起反応検出に必要な最小リンパ節重量に関する検討
4. 上記項目 1、2 及び 3 の結果、並びに第三章までの検討結果を基にした予備試験から本試験までの試験スキームの設定法の検討
5. 4 で設定した試験スキームの 9 化学物質を用いた検証

以上の 5 つである。

これらの検討を行う為に用いた物質と試験条件を表 6 に示した。

表 6 試験に用いた物質と予備試験濃度及び本試験濃度並びに溶媒

Chemical Name	CAS RN	Source	Dose-finding test	Test conc (%)	vehicle
DNCB	97-00-7	Wako	0.50,0.25,0.13,0.06	0.25,0.13,0.06 (v/w)	AOO
Isoeugenol	7646-79-9	Wako	50.0,25.0,12.5,5.00	25.0,12.5,5.0 (v/v)	AOO
HCA	101-86-0	Wako	100,50.0,25.0,12.5	50.0,25.0,12.5 (v/v)	AOO
Glutaraldehyde	111-30-8	Wako	12.5,6.25,3.13,1.56	1.56 (v/v)	DMF
Propyl gallate	121-79-9	Wako	25.0,12.5,6.25,3.13	6.25 (w/v)	AOO
Cinnamic aldehyde	104-55-2	Wako	50.0,25.0,12.5,6.25	12.5 (v/v)	AOO
Resorcinol	108-46-3	Wako	50.0,25.0,12.5,6.25	25.0 (w/v)	AOO
Abietic acid	514-10-3	Nacalai	50.0,25.0,12.5,6.25	25.0 (w/v)	AOO
Nickel(II) hexahydrate	10101-97-0	Sigma-	25.0,12.5,6.25,3.13	25.0 (w/v)	DMSO
Hydroxycitronellal	107-75-5		100,50.0,25.0,12.5	50.0 (v/v)	AOO
Glycerol	56-81-5	Wako	100,50.0,25.0,12.5	100	AOO
Sulfanilamide	63-74-1	Wako	50.0,25.0,12.5,6.25	50.0 (w/v)	DMF

略号: CAS RN: Chemical Abstracts Service Registry Number; Dose finding:

用量設定試験に用いた試験物質濃度; Test conc.: 本試験に用いた試験物質濃度;

v/v: volume/volume; w/v: weight/volume

AOO: acetone:olive oil (4:1, v/v)DMF: *N,N*-dimethylformamide; DMSO: dimethyl sulfoxide;

Nacalai:株式会社ナカライ.; Sigma-Aldrich: Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA;

Wako:和光純薬株式会社.

用量設定試験において、最高濃度は Glutaraldehyde と Propyl gallate に関しては毒性に関する既知情報から設定した。その他は、溶解する最高濃度を用いた。本試験の濃度は、予備試験の結果から設定した。また、試験に用いる溶媒は、既知の LLNA 法などの報告から選択した。

本試験に用いた Acetone, DMF, DMSO は和光純薬株式会社から購入し、オリーブオイルは榎吉田製薬から購入した。

検討結果

1. 予備試験に用いる動物数の検討結果

100%、50%、25%及び12.5%濃度のHCAを各群3匹のマウスに投与した結果を、表7及び図14に示した。

刺激性の指標とした紅斑に関しては、全ての濃度、全ての観察時点で、3匹の動物間で評点は一致した。また、中程度以上の紅斑は観察されなかった(表7)。

同じく刺激の指標とした耳介の腫脹に関しては、4濃度各3匹の動物に関して、左右の耳介それぞれ5回(1、3、5、10及び12日目)測定を行った。その結果、100%濃度の右耳耳介の12日目を除いた全ての測定値の平均値に対する標準偏差は10%以内であり、動物間のばらつきは少ないと判断した(図14 a 及び b)。

耳介リンパ節の重量に関しては、判定に用いる左側リンパ節重量に関する測定値の標準偏差は最大で、100% HCA 暴露時の0.89mg(平均重量は6.2mg)であり、濃度依存性を判定するには大きな影響を与えないと判断した(図14 c)。

以上の結果から、予備試験に用いる動物は1匹で可能であると結論した。

表 7 異なる濃度の HCA を暴露したときの紅斑の値

HCA conc.	Animal	Side	Erythema Score											
			Day1	Day2	Day3	Day4	Day5	Day6	Day7	Day8	Day9	Day10	Day11	Day12
100%	a	Right	0	1	2	2	1	1	0	0	0	0	2	1
		Left	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	b	Right	0	1	2	2	1	1	0	0	0	0	2	1
		Left	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	c	Right	0	1	2	2	1	1	0	0	0	0	2	1
		Left	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
50%	a	Right	0	1	2	2	1	1	0	0	0	0	1	1
		Left	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	b	Right	0	1	2	2	1	1	0	0	0	0	1	1
		Left	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	c	Right	0	1	2	2	1	1	0	0	0	0	1	1
		Left	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25%	a	Right	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		Left	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	b	Right	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		Left	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	c	Right	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		Left	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12.5%	a	Right	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Left	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	b	Right	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Left	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	c	Right	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Left	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

略号: HCA conc. = 試験した HCA 濃度

Side: 評価した耳を示した。Right は右耳、Left は左耳を示す。

a, b, 及び c は、各濃度の HCA を、1,2,3 日目に右耳に、10 日目に両耳に投与したそれぞれのマウス個体を示す。紅斑の判定は、OECD TG442A に従った。

0=紅斑なし、1 =ごく軽度の紅斑 (かろうじて識別できる)、2 = はっきりした紅斑

(本表 7 は、The Journal Toxicological Science, 2015, Vol40, No.2 に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

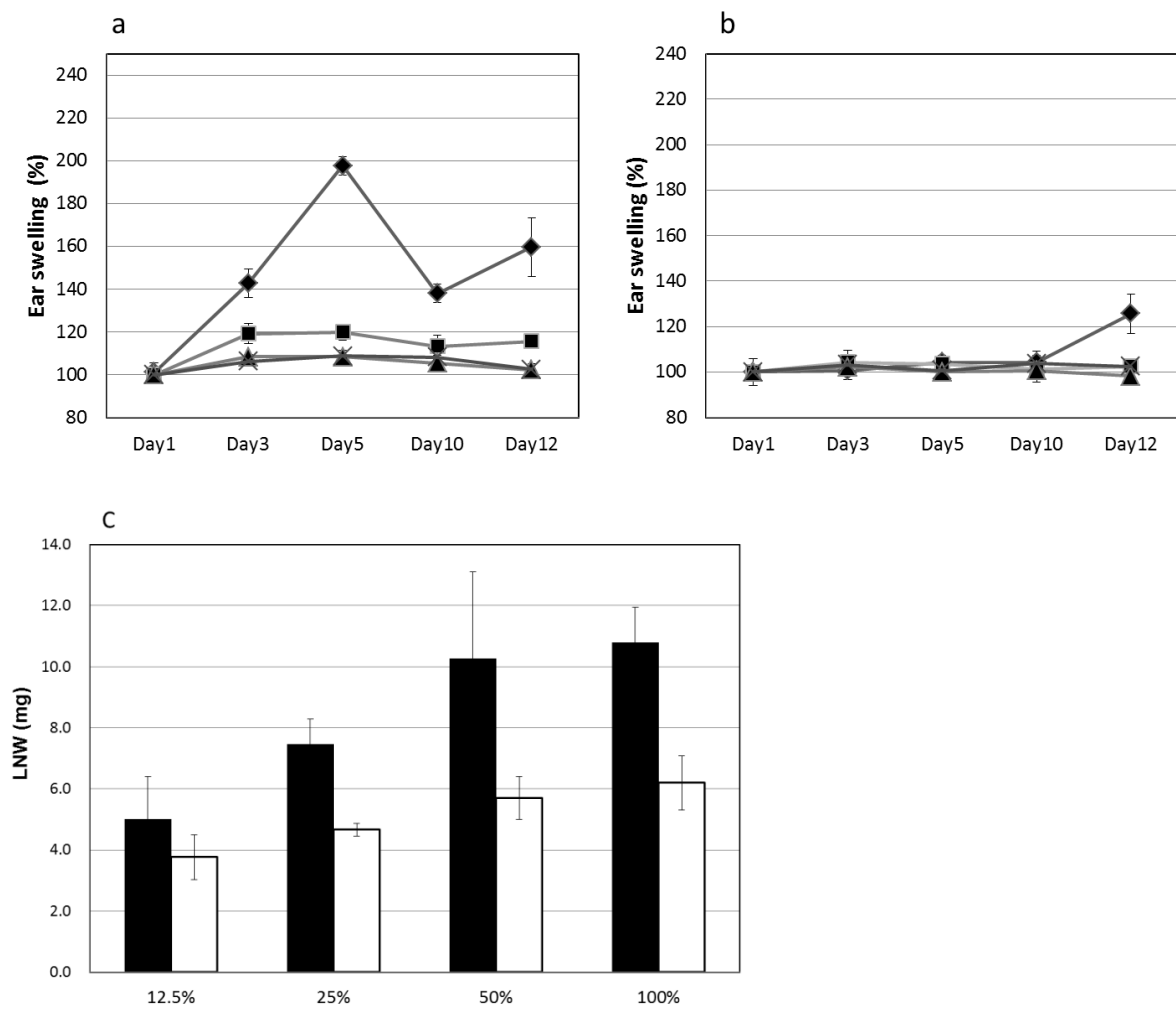


図 14 HCA を用いた予備試験における耳介厚とリンパ節重量の変動の検討

本検討では、4 濃度の HCA を各 3 匹のマウスに投与した。図 a 及び b は、各濃度の HCA を投与したマウスの右(a)及び左(b)の耳介の腫脹の変化を示した。100% HCA を投与した結果は◆、50% HCA は■、25% HCA は▲、12.5% HCA はx.で示した。X 軸は測定日、Y 軸は、試験開始日の投与前を 100%とした場合の相対値を示す。各測定日の値は、平均値±標準偏差 (n=3) で表示した。図 c は、各 12.5%、25%、50%、100%の HCA を投与したマウスの左右の耳介のリンパ節重量を示す。X 軸は HCA 濃度、Y 軸はリンパ節重量を示す。黒カラムは右耳、白カラムは左耳のリンパ節重量を示し、各数値は、平均値±標準偏差(n=3)を示す。

(本図 14 は、The Journal Toxicological Science, 2015, Vol40, No.2 に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

2. IEU 及び DNCB を用いた予備試験に関するモデル検討の結果

1 の検討で、弱感作性物質(HCA)を用いた場合に、予備試験に用いる動物数は 1 匹でよい可能性が示唆された。そこで、次に極度感作性物質 (DNCB) 及び中程度感作性物質(IEU) を用いてモデル予備試験を行った。

表 8 に結果を示した。いずれの前記の濃度を暴露した場合も中程度を超える紅斑 (スコア 3 以上) は認められなかった。

IEU を投与した場合には、いずれの濃度においても、過度の耳介の腫脹は認められなかった。DNCB を用いた場合は、0.5%濃度の投与において、右耳の耳介の腫脹が 170%に達し、過度の刺激が生じていることが示唆された。即ち、過度な刺激を生じない最高濃度は、DNCB が 0.25%であった。

惹起の判定に用いる左側リンパ節重量に関しては、DNCB に関しては最低濃度から最高濃度まで濃度依存的な増加が認められたが、IEU に関しては、25%が最大値を示した。

表 8 濃度設定試験における耳介の紅斑と浮腫及びリンパ節重量

Chemical name	Measurement items	Dose of dose-finding study (%)							
		0.06	0.13	0.25	0.50	5.00	12.5	25.0	50.0
Isoeugenol	Systemic toxicity	nt	nt	nt	nt	—	—	—	—
	Max RE Erythema Score	nt	nt	nt	nt	0	0	1	1
	Max LE Erythema Score	nt	nt	nt	nt	0	0	0	0
	Max RE Swelling (%)	nt	nt	nt	nt	106	111	115	113
	Max LE Swelling (%)	nt	nt	nt	nt	104	100	112	104
	LNW of RE (mg)	nt	nt	nt	nt	4.2	6.7	8.7	11.0
	LNW of LE (mg)	nt	nt	nt	nt	3.5	4.3	5.7	5.2
DNCB	Systemic toxicity	—	—	—	—	nt	nt	nt	nt
	Max RE Erythema Score	0	1	2	2	nt	nt	nt	nt
	Max LE Erythema Score	0	1	1	2	nt	nt	nt	nt
	Max RE Swelling (%)	100	100	104	170	nt	nt	nt	nt
	Max LE Swelling (%)	100	100	104	111	nt	nt	nt	nt
	LNW of RE (mg)	3.0	4.9	12.0	15.4	nt	nt	nt	nt
	LNW of LE (mg)	3.0	4.0	7.4	8.5	nt	nt	nt	nt

本検討では、各 4 濃度の Isoeugenol, DNCB を各 1 匹のマウスに投与した。1、2、3 日目は右耳に、10 日目は両耳に投与し、12 日目にリンパ節を摘出した。紅斑、耳介腫脹、全身毒性は、OECD TG442A の記載に従い実施した。

略号: LNW =リンパ節重量; Max RE Erythema Score =試験期間中に右耳で観察された最大の紅斑スコア; Max LE Erythema Score =試験期間中に左耳で観察された最大の紅斑スコア; Max RE swelling (%) =試験期間中に右耳で観察された最大の耳介の腫脹; Max LE swelling (%) =試験期間中に左耳で観察された最大の耳介の腫脹; LNW of RE (mg)=12 日目の右側耳介リンパ節重量; LNW of LE (mg) =12 日目の左側耳介リンパ節重量; nt = 試験実施せず; — = 試験期間中に全身毒性は認められなかった; + = 試験期間中に全身毒性が認められた。

(本表 8 は、The Journal Toxicological Science, 2015, Vol40, No.2 に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

3. 惹起に必要な最低濃度の検討結果

LLNA:DAE 法は、1 濃度で感作性が判定できるのが、最大のメリットである。そこで、1 濃度で確実に惹起反応を検出できる条件を見出す事を目的に、それぞれ 3 濃度の HCA, DNCB, IEU を用いた LLNA:DAE 法の試験を行った。結果を図 15 に示した。

本検討において、試験に用いる最高濃度は、前述の 1 及び 2 に示した結果から、HCA は 50%、DNCB は 0.25%、IEU は 25%とした。

図 15 に示したように、今回試験した全ての濃度で惹起反応が認められた。即ち、過度の刺激を生じない範囲、即ち紅斑のスコア 2 以下及び耳介の腫脹が 25%未満の濃度範囲において、十分な惹起反応を検出できることが明らかとなった。また、今回惹起反応が認められた、試験群の耳介の最低リンパ節重量は、3.0mg（右側）及び 2.7mg（左側）であり、これはいずれも 0.06% DNCB を投与した条件の値である。

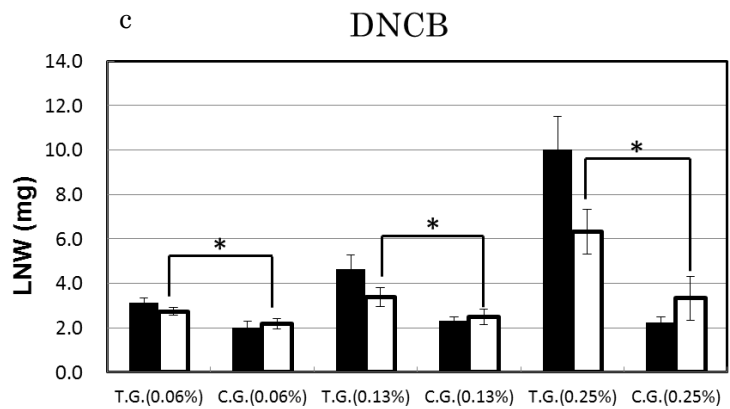
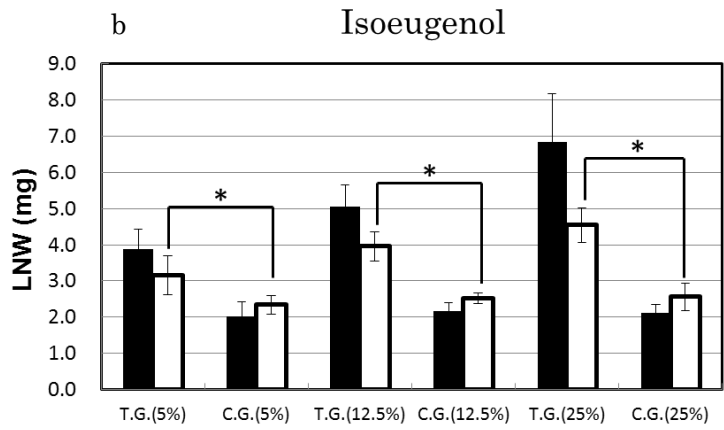
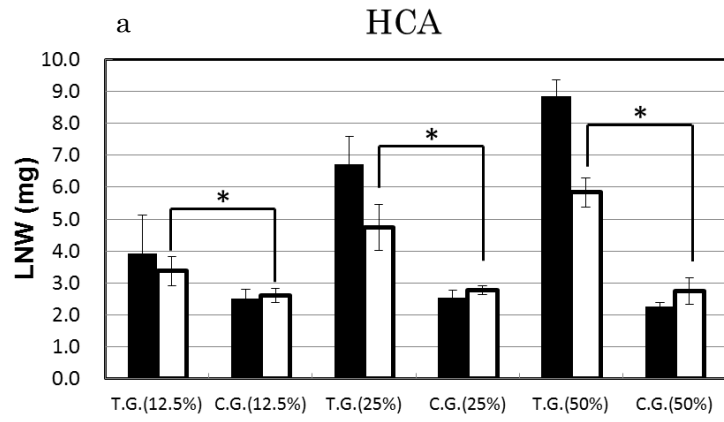


図 15 惹起に必要な最低濃度の検討結果

本検討では、各 3 濃度の HCA、IEU、DNCB を各 5 匹のマウスに投与した。試験群では、1、2、3 日目は右耳に、10 日目は両耳に投与した。コントロール群では、10 日目に左耳に投与した。12 日目に、全てのマウスのリンパ節を摘出した。紅斑、耳介腫脹、全身毒性は、OECD TG442A の記載に従い実施した。

図 a、b 及び c は、各濃度の HCA、Isoeugenol、DNCB を投与したマウスの右左のリンパ節重量を示した。黒カラムは右耳、白カラムは左耳のリンパ節重量を示し、各数値は、平均値±標準偏差(n=5)を示した。

X 軸は、各投与群を示し、Y 軸はリンパ節重量を示した。

略号: T.G.=試験群; C.G.=コントロール群

* は、試験群とコントロール群の左耳のリンパ節重量に、統計的有意差が認められたことを示す。

統計学的優位差は、p131 に記載の手法で検定した。

(本図 15 は、The Journal Toxicological Science, 2015, Vol40, No.2 に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

4. 予備試験結果から本試験濃度を決定するスキームの検討結果

予備試験結果から本試験濃度を決定するスキームについて、以下のように決定した。

刺激性に関しては本章 3 の検討から、弱感作性物質から極度感作性物質まで、いずれも過度の刺激を生じない試験条件で、惹起反応が検出できることが明らかとなった。そこで、LLNA:DAE 法において予備試験結果から本試験濃度を決定する場合に、左右いずれの耳介においても過度な刺激を生じない濃度範囲から選択することとした。

リンパ節重量に関しては、今回の検討においては、試験群の左耳の平均リンパ節重量が、最低 2.7mg の時にも惹起反応が検出されていた。一方、第三章の 24 物質を用いた検討結果（図 13）の結果から、弱感作性物質を評価した場合においても、試験群の左耳の平均リンパ節重量が約 3mg 以上あれば惹起反応が検出できることが示唆された。左側リンパ節重量、すなわち惹起側のリンパ節重量のばらつきに関しては、本章 1 の予備試験の検討において、最大 0.89mg の標準偏差が認められている。以上のことから、個体間のばらつきも考慮し、左側のリンパ節重量が 4mg 以上になる濃度を用いれば、十分惹起反応を検出できると結論した。

以上の結果をまとめ、予備試験結果から本試験濃度を決定するスキームを次の様に決定した。

1. 使用するマウスは、CBA/J の雌（9 週齢で試験開始が望ましい）とする。
2. 濃度設定試験には、1 匹のマウスを用いて行い、最高濃度は、液体の場合 100%、固体の場合は溶解する最高濃度とする。ただし、試験物質の毒性に関し、既知の情報がある場合にはそれを参考に決定する。濃度は 4 段階設定する。
3. 紅斑、耳介の浮腫の測定は、少なくとも 1、3、5、10、12 日目の試験物質暴露前に行う。
4. 12 日目にリンパ節摘出と、リンパ節重量の測定を行う。
5. 左耳のリンパ節重量が 4mg 以上の場合は、4mg 以上となる最低濃度を本試験に用いる。
6. 全ての暴露濃度において、左耳のリンパ節重量が 4mg 未満の場合は、最大のリンパ節重量を与えた濃度を本試験に用いる。いずれの場合でも、試験濃度は、全身毒性を示さない濃度かつ、過度の刺激、即ち紅斑 3 以上もしくは、25%以上の耳介の腫脹を生じない濃度範囲で選択する。

5. 9種類の化合物を用いた試験方法の検証結果

本章4の検討で、LLNA:DAE法の予備試験から本試験までの試験プロトコールを作成した。本検討では、このプロトコールの検証を9種類の化学物質を用いて行った。即ち、感作性に関して既知の9物質を新規化学物質と仮定し、作成した試験プロトコールに基づいて試験し、結果を既知情報と比較した。

予備試験

9種類の化学物質を用いた予備試験の結果を表9に示した。

今回の試験条件において、3.13%以上の Glutaraldehyde、25%の Propyl gallate、50%の Cinnamic aldehyde 及び 50%の Abietic acid を暴露したときに、12日目の体重測定において5%以上の減少が認められた。これは全身毒性を示すと判断し、これらの濃度は、上記4物質の本試験に用いないこととした。今回の全ての試験条件において、過度の紅斑は観察されなかったが、耳介の腫脹に関しては、Resorcinol の 50%濃度において169%の増加が右側耳介に認められた。以上の結果から、この濃度は、Resorcinol の本試験に用いないこととした。上記に示した過度な刺激を生じた濃度を除いた範囲で、左側リンパ節重量を指標に本試験濃度を決定した。

本試験濃度は、それぞれ、以下述べる理由で設定した。

Glutaraldehyde は、1.56%が最大のリンパ節重量であったため、1.56%とした。

Propyl gallate は、6.25%が最大のリンパ節重量であったため、6.25%とした。

Cinnamic aldehyde は、4mg を越える最低濃度が12.5%であったため、12.5%とした。

Nickel(II) hexahydrate は、25%が最大のリンパ節重量であったため、25%とした。

Resorcinol は、25%が最大のリンパ節重量であったため、25%とした。

Abietic acid は25%が最大のリンパ節重量であったため、25%とした。

Hydroxycitronell は、4mg を越える最低濃度が50%であったため、50%とした。

Sulfanilamide は、最大のリンパ節重量を与えたのは、12.5%であった。しかしながら、いずれの濃度においても、その絶対値は、ナイーブマウスのリンパ節重量のばらつきの範囲であると考えられたため、暴露できる最高濃度の50%を本試験濃度とした。

Glycerol も、Sulfanilamide と同様の理由で、暴露できる最高濃度の 100% を本試験濃度とした。

表 9 検証試験における耳介の紅斑、浮腫、リンパ節重量

Chemical name	Measurement items	Dose of dose-finding study (%)							
		0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0	100
Glutaraldehyde	Systemic toxicity	—	—	+	+	nt	nt	nt	nt
	Max RE Erythema	0	0	1	1	nt	nt	nt	nt
	Max LE Erythema	0	0	0	0	nt	nt	nt	nt
	Max RE Swelling (%)	106	108	141	165	nt	nt	nt	nt
	Max LE Swelling (%)	100	108	106	100	nt	nt	nt	nt
	LNW of RE(mg)	4.9	4.4	6.8	7.7	nt	nt	nt	nt
	LNW of LE(mg)	2.7	2.9	2.8	5.0	nt	nt	nt	nt
Propyl gallate	Systemic toxicity	nt	nt	—	—	—	+	nt	nt
	Max RE Erythema	nt	nt	0	0	0	1	nt	nt
	Max LE Erythema	nt	nt	0	0	0	1	nt	nt
	Max RE Swelling (%)	nt	nt	100	104	104	106	nt	nt
	Max LE Swelling (%)	nt	nt	104	104	106	102	nt	nt
	LNW of RE(mg)	nt	nt	3.8	4.4	4.3	6.1	nt	nt
	LNW of LE(mg)	nt	nt	3.0	3.4	3.3	4.1	nt	nt
Resorcinol	Systemic toxicity	nt	nt	nt	—	—	—	—	nt
	Max RE Erythema	nt	nt	nt	0	0	0	1	nt
	Max LE Erythema	nt	nt	nt	0	0	0	0	nt
	Max RE Swelling (%)	nt	nt	nt	107	119	121	169	nt
	Max LE Swelling (%)	nt	nt	nt	110	110	108	104	nt
	LNW of RE(mg)	nt	nt	nt	2.9	5.0	6.8	7.3	nt
	LNW of LE(mg)	nt	nt	nt	2.5	2.4	2.8	3.8	nt
NiSO ₄	Systemic toxicity	nt	nt	—	—	—	—	nt	nt
	Max RE Erythema	nt	nt	0	0	1	1	nt	nt
	Max LE Erythema	nt	nt	0	0	0	0	nt	nt
	Max RE Swelling (%)	nt	nt	116	114	118	116	nt	nt
	Max LE Swelling (%)	nt	nt	108	106	108	106	nt	nt
	LNW of RE(mg)	nt	nt	2.5	3.5	5.0	6.5	nt	nt
	LNW of LE(mg)	nt	nt	1.8	2.2	2.7	3.1	nt	nt

表 9 続き

Cinnamic aldehyde	Systemic toxicity	nt	nt	nt	—	—	—	+	nt
	Max RE Erythema	nt	nt	nt	0	0	1	1	nt
	Max LE Erythema	nt	nt	nt	0	0	0	0	nt
	Max RE Swelling (%)	nt	nt	nt	100	102	100	119	nt
	Max LE Swelling (%)	nt	nt	nt	100	100	100	100	nt
	LNW of RE(mg)	nt	nt	nt	4.2	6.3	9.4	10.0	nt
	LNW of LE(mg)	nt	nt	nt	3.5	4.5	5.5	5.8	nt
Abietic acid	Systemic toxicity	nt	nt	nt	—	—	—	+	nt
	Max RE Erythema	nt	nt	nt	0	0	0	1	nt
	Max LE Erythema	nt	nt	nt	0	0	0	0	nt
	Max RE Swelling (%)	nt	nt	nt	102	100	109	122	nt
	Max LE Swelling (%)	nt	nt	nt	102	100	100	104	nt
	LNW of RE (mg)	nt	nt	nt	3.0	4.3	7.9	5.3	nt
	LNW of LE (mg)	nt	nt	nt	2.5	2.7	6.0	4.1	nt
Hydroxy-citronellal	Systemic toxicity	nt	nt	nt	nt	—	—	—	—
	Max RE Erythema	nt	nt	nt	nt	0	0	0	0
	Max LE Erythema	nt	nt	nt	nt	0	0	0	0
	Max RE Swelling (%)	nt	nt	nt	nt	100	108	108	112
	Max LE Swelling (%)	nt	nt	nt	nt	106	109	104	100
	LNW of RE (mg)	nt	nt	nt	nt	2.4	5.0	8.0	10.6
	LNW of LE(mg)	nt	nt	nt	nt	2.0	3.1	5.0	5.4
Sulfanilamide	Systemic toxicity	nt	nt	nt	—	—	—	—	nt
	Max RE erythema	nt	nt	nt	0	0	0	0	nt
	Max LE Erythema	nt	nt	nt	0	0	0	0	nt
	Max RE Swelling (%)	nt	nt	nt	102	106	108	108	nt
	Max LE Swelling (%)	nt	nt	nt	106	100	100	100	nt
	LNW of RE (mg)	nt	nt	nt	2.3	2.6	2.3	2.0	nt
	LNW of LE (mg)	nt	nt	nt	2.2	2.4	2.3	2.2	nt
Glycerol	Systemic toxicity	nt	nt	nt	nt	—	—	—	—
	Max RE Erythema	nt	nt	nt	nt	0	0	0	0
	Max LE Erythema	nt	nt	nt	nt	0	0	0	0
	Max RE Swelling (%)	nt	nt	nt	nt	100	100	100	104
	Max LE Swelling (%)	nt	nt	nt	nt	102	104	102	102
	LNW of RE (mg)	nt	nt	nt	nt	2.4	2.5	2.3	2.2
	LNW of LE (mg)	nt	nt	nt	nt	2.4	2.5	2.3	2.2

本検討では、9物質を用いて予備試験を行った。各4段階の試験物質を各1匹のマウスに投与した。1、2、3日目は右耳に、10日目は両耳に投与し、12日目にリンパ節を摘出した。紅斑、耳介腫脹、全身毒性は、OECD TG442Aの判定基準に従い実施した。

略号: LNW =リンパ節重量; Max RE Erythema =試験期間中に右耳で観察された最大の紅斑スコア; Max LE Erythema =試験期間中に左耳で観察された最大の紅斑スコア; Max RE swelling (%) =試験期間中に右耳で観察された最大の耳介の腫脹; Max LE swelling (%) =試験期間中に左耳で観察された最大の耳介の腫脹; LNW of RE (mg)=12日目の右側耳介リンパ節重量; LNW of LE (mg) =12日目の左側耳介リンパ節重量; nt = 試験実施せず; - = 試験期間中に全身毒性は認められなかった; + = 試験期間中に全身毒性が認められた。

(本表9は、The Journal Toxicological Science, 2015, Vol40, No.2に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

本試験

9種類の化学物質を用いた本試験の結果を図16に示した。

本試験の結果、Glutaraldehyde、Propyl gallate、Cinnamic aldehyde、Nickel(II) hexahydrate、Resorcinol、Abietic acid 及び Hydroxycitronell は惹起反応が認められ、これらが感作性を有すると判定された。一方 Sulfanilamide 及び Glycerol は惹起反応を誘発せず、感作性は有しないと判定された。これらの結果は、いずれも既報の LLNA 法の結果と一致した。

この結果は、本章で設定した予備試験試験プロトコールが、LLNA:DAE 法を用いて、新規化学物質の皮膚感作性評価を行う際に有効である事を示唆する結果である。

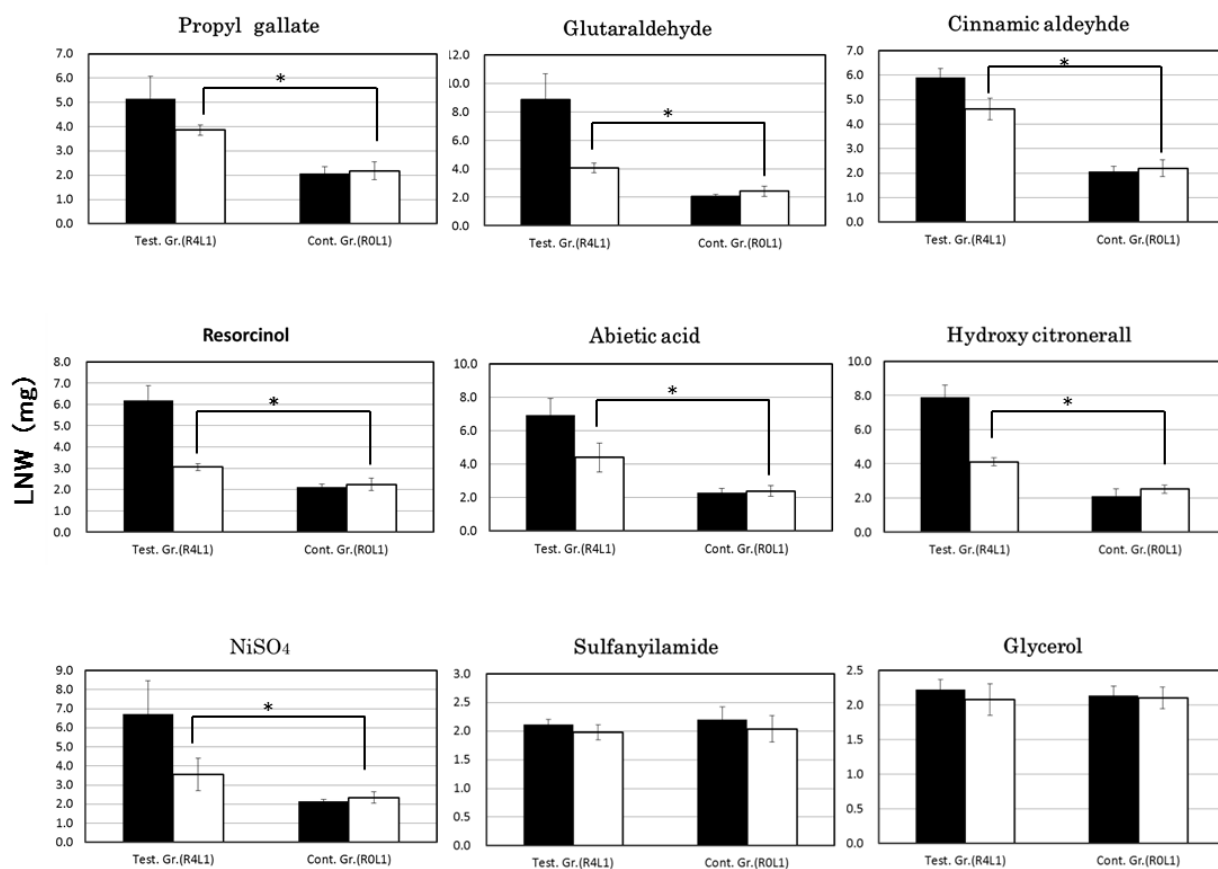


図 16 9 種類の化学物質を用いた試験法の検証結果

9 物質を用いて行った LLNA:DAE 法の試験スキームの検証結果を示した。試験群では、各 1 濃度の試験物質を、1、2、3 日目は右耳に、10 日目は両耳に投与した。コントロール群では、10 日目に左耳に投与した。12 日目に、全てのマウスのリンパ節を摘出した。紅斑、耳介腫脹、全身毒性は、OECD TG442A の記載に従い実施した。黒カラムは右耳、白カラムは左耳のリンパ節重量を示し、各数値は、平均値±標準偏差 (n=5)を示した。X 軸は、各投与群を示し、Y 軸はリンパ節重量を示した。

* は、試験群とコントロール群の左耳のリンパ節重量に、統計的有意差が認められたことを示す。統計学的優位差は、p131 に記載の手法で検定した。

略号: Test.Gr.= 試験群; Cont.Gr.=コントロール群; R4L1.=右耳に 4 回、左耳に 1 回の投与; R0L1=左耳に 1 回の投与

(本図 16 は、The Journal Toxicological Science, 2015, Vol40, No.2 に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

考察

LLNA:DAE 法を単独の新規皮膚感作性試験法として確立するために、濃度設定を含めた試験方法の確立を目的に 5 つの検討を行った。

表 7 及び図 14 に示した HCA を用いた検討の結果、予備試験に用いる動物は 1 匹で可能であると結論した。即ち、紅斑、耳介の腫脹に関しては、3 匹のマウスの結果は非常によく一致した。また耳介リンパ節の重量に関しては、判定に用いない右側リンパ節の重量に関する測定値の標準偏差は最大で 2.8mg、一方判定に用いる左側リンパ節重量に関する測定値の標準偏差は最大で 0.89mg（平均値は 6.2mg）であり、右側の方が大きかった。これは、右側は 4 回の投与を行うため、投与などのばらつきや、動物の個体差が蓄積された結果であると考えた。左側リンパ節に関しては、ばらつきは少なく、試験における濃度依存性を判定するには大きな影響を与えないと判断した。これは、LLNA:DAE 法では、感作性の判定に用いる左耳は、1 回しか投与しないことが理由であると考えられる。

動物愛護の観点から、試験に使用する動物は削減することが望ましく、この点からも各濃度 1 匹で行えることは非常に意味があると考えられる。

次に、惹起に必要な最低濃度の検討の為に、それぞれ 3 濃度の HCA、IEU、DNCB を用いて行った試験結果を図 15 に示した。図 15 に示したように、今回試験した全ての濃度で惹起反応が認められ、今回試験した HCA 及び DNCB の最低濃度は、それぞれの EC3 値に近い値であり、第三章の 24 物質を用いた検証結果と合わせて、LLNA:DAE 法が LLNA 法と同程度の試験濃度で感作性を判定できることが明らかとなった。

本章における検討と第三章で得られたデータから、LLNA:DAE 法を未知の化学物質に適用するための試験スキームの設定し、本スキームに基づいて、9 種類の物質の評価を実施した。この 9 種類は、強度感作性物質が 2 種類、中程度感作性物質が 3 種類、弱感作性物質 2 種類、非感作性物質 2 種類を選択した。

本章で設定したスキームに従い試験した結果、試験した 9 種類の結果は、いずれも既報の LLNA 法の結果と一致した（図 16）。

本章までの検討で、LLNA:DAE 法を用いて 33 物質の化学物質の評価を行った。その結果、NiCl₂を除く 32 物質の結果が LLNA 法と一致した。即ち、LLNA:DAE 法の LLNA 法に対する accuracy は 97%であり、惹起相を含む独立した新規 LLNA 法として十分な成績であると考えられた。

また、新規皮膚感作性試験法を開発する場合、試験物質に対する測定項目の反応の濃度依存性が重要な指標となる。既存の LLNA 法の判定においても濃度依存性が重要な判断項目となる。これは、化学物質により、試験濃度と SI 値の相関において逆U字型の反応を示す場合が有ることが知られているからである。この点において、LLNA:DAE 法は 1 濃度で判定するために、本試験において濃度依存性を見ることはできない。しかしながら、今回提案した予備試験では、コントロール群は設けないが、本試験と同じプロトコールで試験を行う。即ち、本章の図 14 や、表 9 に示した様に、右耳のリンパ節重量で感作における濃度依存性は判断することが出来る。従って、今回提案した予備試験を行うことで、単独の皮膚感作性試験法としての LLNA:DAE 法の有用性が更に高まると考える。

第五章 LLNA:DAE 法の結果の定量性に関する検討

本章における検討の背景と課題

第四章までの検討で、LLNA:DAE 法が単独の皮膚感作性試験法として活用できる可能性が示唆された。そこで本章では LLNA:DAE 法の結果の定量性に関する検討を行った。

LLNA 法が従来のモルモットを用いた試験法と比較し、より優れているとされる点として、試験結果の定量性に優れていることが挙げられる。即ち、従来のモルモットを用いた試験法は、感作は過度の刺激を起さない最高濃度で行い、惹起は刺激の出ない濃度で行う事とされている。即ち、試験に用いる 2 つの濃度は化学物質の皮膚刺激性に依存する。例えば酸やアルカリなどは、皮膚に対する刺激性が強いため、高濃度での試験は出来ない。また、結果の判定は、感作された動物数を指標に感作率で比較する。例えば、10 匹の動物を試験に供し、仮に 3 匹の動物に惹起反応が観察された場合、感作率は 30%となる。これは、この場合、皮膚反応の強度は最終的な感作性強度の判定には含められない。これらの事から、モルモットを用いる手法は、化学物質間の感作性強度について直接的な比較をすることが難しい。

一方 LLNA 法では、序論の図 5 に示したように、少なくとも 3 段階の濃度の化学物質を耳介に暴露し、それぞれの濃度により引き起こされるリンパ節の増殖をリンパ節へのトリチウムチミジンの取り込み量の比 (SI 値) として定量化する。そして感作性の有無の判定は、コントロールに比較して、SI 値が 3 倍を越えるか否かで判定し、さらに感作性の強度は、SI 値が 3 を超える濃度 (EC3 値) で比較する。この場合 EC3 値が低い、即ち SI 値が 3 を越えるのに必要な化学物質の濃度が低いほど、感作性が強いことを意味する。

LLNA:DAE 法を単独の試験法として活用する場合、感作性強度を比較することが出来れば、更に試験法としての有効性が高まる。そこで、LLNA:DAE 法の結果から、LLNA 法の EC3 値のように、感作性強度の判定に用いる指標が得られないか検討した。

本章では、新規な指標として、試験物質 1%ごとに誘導される左耳のリンパ節の惹起重量と、リンパ節に一定量の惹起を誘導するのに必要な試験物質濃度、の両面から検討を行った。

検討結果

1. LLNA:DAE 法を用いて、第三章及び第四章で検討した計 33 物質の左側リンパ節重量から、試験物質 1%ごとに誘導される左耳のリンパ節の惹起重量を算出した。

DILL value : degree of increment of lymph node weight of left ear = (試験群の左耳のリンパ節重量－コントロール群の左耳のリンパ節重量) / 試験濃度(%)

(DILL value:試験物質 1%毎に誘導される左耳のリンパ節の惹起重量の計算値)

2. LLNA:DAE 法を用いて、第三章及び第四章で報告した 33 物質に本論文第七章で検討した 8 物質(Undecylenic acid, Oleic acid, Linoleic acid, Linolenic acid, Maleic acid, Fumaric acid, Succinic acid and Squalene)を加えた計 41 物質のうち、皮膚感作性陽性と判定された 29 物質の左側リンパ節重量から、一定量の惹起を左耳リンパ節に誘導するのに必要な試験物質濃度をもとめた。

EC1mg%: estimated concentration needed to produce 1mg increment of LNW =

試験濃度 / (試験群の左耳のリンパ節重量－コントロール群の左耳のリンパ節重量)

(EC1mg%:1mg の惹起を左耳リンパ節に誘導するのに必要な試験物質濃度)

これらの指標を用いることで、LLNA:DAE 法の結果を、皮膚感作性物質の感作性強度の評価に用いることが出来る可能性が示された。

DILL value を算出した結果を LLNA 法で報告されている感作性強度並びに EC3 値とともに表 10 に示した。

DILL value を基に序列化した感作性強度と、LLNA 法の EC3 値を基に提案されている感作性クラス(Class of Skin-Sensitizing Potency:C of SS potency) は、LLNA 法で Moderate とされている 2-Mercaptobenzothiazole, NiSO₄ 及び Resorcinol が Weak に近い値を示した以外よく一致した。

今回の 33 物資の分析において、極度感作性物質(Extreme)の DILL value は 2.00~14.0、強度感作性物質(Strong)は 0.27~1.09、上記 3 つを除く中程度感作性物質(Moderate)は、0.12~0.19、弱感作性物質(Weak) は 0.02~0.1 及び感作性陰性の物質は、Chlorobenzen (DILL value;0.01) を除く 7 種全てが 0.00 であった。

表 10 DILL value と LLNA 法で分類された感作性強度の比較

Chemical name	Test conc.	LNW of LE of TG	LNW of LE of CG	DILL values	C of SS Potency	EC3 (%)
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	0.05 ^a	2.7 ^a	2.0 ^a	14.0	Extreme ^b	0.005 ^b
2,4-Dinitrofluorobenzene	0.25 ^a	7.3 ^a	4.2 ^a	12.0	Extreme ^b	0.03 ^b
2,4-Dinitrochlorobenzene	0.25 ^a	5.1 ^a	2.7 ^a	9.60	Extreme ^b	0.05 ^b
p-Benzoquinone	1.00 ^a	5.3 ^a	3.3 ^a	2.00	Extreme ^b	0.0099 ^b
Glutaraldehyde	1.56	4.1	2.4	1.09	Strong ^b	0.1 ^b
Hydroquinone	1.00 ^a	3.3 ^a	2.3 ^a	1.00	Strong ^b	0.11 ^b
Cobalt chloride	5.00 ^a	5.2 ^a	2.7 ^a	0.50	Strong ^b	0.6 ^b
p-Phenylenediamine	2.50 ^a	3.3 ^a	2.4 ^a	0.36	Strong ^b	0.16 ^b
Propyl gallate	6.25	3.9	2.2	0.27	Strong ^b	0.32 ^b
Cinnamic aldehyde	12.5	4.6	2.2	0.19	Moderate ^b	3.0 ^b
NiCl ₂	10.0 ^a	4.6 ^a	3.2 ^a	0.14	N.C. ^b	
Isoeugenol	10.0 ^a	3.7 ^a	2.5 ^a	0.12	Moderate ^b	1.2 ^b
Citral	25.0 ^a	5.1 ^a	2.7 ^a	0.10	Weak ^b	13 ^b
Phenyl benzoate	10.0 ^a	3.0 ^a	2.1 ^a	0.09	Weak ^b	17 ^b
Abietic acid	25.0	4.4	2.4	0.08	Weak ^b	15 ^b
2-Mercaptobenzothiazole	25.0 ^a	4.5 ^a	2.8 ^a	0.07	Moderate ^b	1.7 ^b
Cinnamic alcohol	25.0 ^a	3.5 ^a	1.9 ^a	0.06	Weak ^b	21 ^b
NiSO ₄	25.0	3.6	2.3	0.05	Moderate ^b	4.8 ^b
Resorcinol	25.0	3.2	2.2	0.04	Moderate ^b	5.7 ^b
Hexyl cinnamic aldehyde	25.0 ^a	4.0 ^a	2.9 ^a	0.04	Weak ^b	11 ^b
Eugenol	50.0 ^a	3.8 ^a	2.0 ^a	0.04	Weak ^b	13 ^b
Hydroxycitronellal	50.0	4.1	2.5	0.03	Weak ^b	33 ^b
Imidazolidinyl urea	40.0 ^a	3.3 ^a	2.2 ^a	0.03	Weak ^b	24 ^b
Ethyleneglycol dimethacrylate	50.0 ^a	3.1 ^a	2.3 ^a	0.02	Weak ^b	28 ^b
Methyl methacrylate	100 ^a	4.4 ^a	2.3 ^a	0.02	Weak ^b	90 ^b
Sulfanilamide	50.0	2.0	2.0	0.00	- ^b	
Glycerol	100	2.1	2.1	0.00	- ^b	
Chlorobenzene	25.0 ^a	2.7 ^a	2.4 ^a	0.01	- ^b	
Isopropanol	50.0 ^a	2.3 ^a	2.3 ^a	0.00	- ^b	
Lactic acid	25.0 ^a	2.0 ^a	2.2 ^a	0.00	- ^b	
Methyl salicylate	50.0 ^a	2.5 ^a	2.3 ^a	0.00	- ^b	
Salicylic acid	50.0 ^a	2.2 ^a	2.2 ^a	0.00	- ^b	
n-Hexane	100 ^a	3.0 ^a	2.7 ^a	0.00	- ^b	

略号: Test conc.: 試験濃度; LNW of LE of TG; 試験群の左耳リンパ節重量; LNW of LE of CG: コントロール群の左耳リンパ節重量; DILL Values: Degree of increment of left ear lymph node weight; C of SS Potency: 皮膚感作性強度のクラス; Extreme: 極度感作性物質; Strong: 強度感作性物質; Moderate: 中程度感作性物質; Weak: 弱感作性物質; — = 非感作性物質.

一部のリンパ節重量のデータは、^aYamashita *et al.* (2014)から引用した。皮膚感作性強度と EC3 の値は、^bNukada *et al.* (2013)から引用した。

(本表 10 は、The Journal Toxicological Science, 2015, Vol40, No.2 に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

次に、本章式 2 に示した EC1mg% と同様に計算した、EC2mg%、EC0.5mg%及び EC0.25mg% と LLNA 法で報告されている EC3 値を表 11 に示した。

LLNA 法の EC3 値を基に $1\% <$ 、 $1\% \leq EC3 < 10\%$ 、 $10\% \leq$ の 3 区分に分類した場合、区分が一致しているのは、EC2mg% の場合 16/29 であった。EC1mg% の場合は 20/29、EC0.5mg% の場合は 18/29、EC0.25mg% の場合は 18/29 であった。また、EC2mg% の場合は、EC3 値が 10% 以上の場合の一致率が高く (13/13)、一方 EC3 値が 10% 未満の場合は、EC0.25mg% の場合の一致率が一番高かった (16/16)。

表 11 一定量の惹起を引き起こすのに必要な濃度と EC3 値の比較

Chemical name	TC (%)	LNW of LE of TG	LNW of LE of CG	EC2mg%	EC1mg%	EC0.5m%	EC0.25mg%	LLNA (EC3)%
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	0.05	2.7 ^(a)	2.0	0.14	0.07	0.04	0.02	0.005 ^(a)
2,4-Dinitrofluorobenzene	0.25	7.3 ^(a)	4.2	0.16	0.08	0.04	0.02	0.03 ^(a)
2,4-Dinitrochlorobenzene	0.25	5.1 ^(a)	2.7	0.21	0.10	0.05	0.03	0.05 ^(a)
p-Benzoquinone	1.00	5.3 ^(a)	3.3	1.00	0.50	0.25	0.13	0.0099 ^(a)
Glutaraldehyde	1.56	4.1 ^(a)	2.4	1.84	0.92	0.46	0.23	0.1 ^(a)
Hydroquinone	1.00	3.3 ^(a)	2.3	2.00	1.00	0.50	0.25	0.11 ^(a)
p-Phenylenediamine	2.50	3.3 ^(a)	2.4	5.56	2.78	1.39	0.69	0.16 ^(a)
Propyl gallate	6.25	3.9 ^(a)	2.0	6.58	3.29	1.64	0.82	0.32 ^(a)
Cobalt chloride	5.00	5.2 ^(a)	2.7	4.00	2.00	1.00	0.50	0.6 ^(a)
Isoeugenol	10	3.7 ^(a)	2.5	16.67	8.33	4.17	2.08	1.2 ^(a)
2-Mercaptobenzothiazole	25	4.5 ^(a)	2.8	29.41	14.71	7.35	3.66	1.7 ^(a)
Cinnamic aldehyde	12.5	4.6 ^(a)	2.2	10.42	5.21	2.60	1.30	3.0 ^(a)
Nichel sulphate	25	3.6 ^(a)	2.3	38.46	19.23	9.62	4.81	4.80 ^(a)
Maleic acid	50	5.4 ^(b)	3.4	50.00	25.00	12.5	6.25	4.10
Resorcinol	25	3.2 ^(a)	2.2	50.00	25.00	12.50	6.25	5.70 ^(a)
Linolenic acid	25	3.4 ^(b)	2.6	62.50	31.25	15.63	7.81	9.80
Oleic acid	10	2.8 ^(b)	2.1	28.57	14.29	7.14	3.57	10.10
Hexylcinnamic aldehyde	25	4.0 ^(a)	2.9	45.45	22.73	11.36	5.68	11.00 ^(a)
Eugenol	50	3.8 ^(a)	2.0	55.56	27.78	13.89	6.94	13.00 ^(a)
Citral	25	5.1 ^(a)	2.7	20.83	10.42	5.21	2.60	13 ^(a)
Linoleic acid	25	3.4 ^(b)	2.4	50.00	25.00	12.50	6.25	14
Abietic acid	25	4.4 ^(a)	2.4	25.00	12.50	6.25	3.13	15 ^(a)
Phenyl benzoate	10	3.0 ^(a)	2.1	22.22	11.11	5.56	2.78	17 ^(a)
Undecylenic acid	25	3.1 ^(b)	2.4 ^(b)	71.43	35.71	17.86	8.93	19.4
Cinnamic alcohol	25	3.5 ^(a)	1.9 ^(a)	31.25	15.63	7.81	3.91	21 ^(a)
Imidazolidinyl urea	40	3.3 ^(a)	2.2 ^(a)	72.73	36.36	18.18	9.09	24 ^(a)
Ethylene glycol dimethacrylate	40	3.1 ^(a)	2.3 ^(a)	100.00	50.00	25.00	12.50	28 ^(a)
Hydroxycitronellal	50	4.1 ^(a)	2.5 ^(a)	62.50	31.25	15.63	7.81	33 ^(a)
Methyl methacrylate	100	4.4 ^(a)	2.3 ^(a)	95.24	47.62	23.81	11.90	90 ^(a)

EC2mg%= 2mg の惹起を左耳リンパ節に誘導するのに必要な試験物質濃度の計算値

EC1mg%= 1mg の惹起を左耳リンパ節に誘導するのに必要な試験物質濃度の計算値

EC0.5mg%= 0.5mg の惹起を左耳リンパ節に誘導するのに必要な試験物質濃度の計算値

EC0.25mg%= 0.25mg の惹起を左耳リンパ節に誘導するのに必要な試験物質濃度の計算値

太字 =感作性強度区分を、 EC3 値を基に $1\% < 1\% \leq EC3 < 10\%$, $10\% \leq$ に分類した感作性強度区分と分類区分が同じ化合物

略号: TC (%): Test concentrations; LNW of LE of TG: Lymph node weight of left ear for the test group; LNW of LE of CG: Lymph node weight of left ear for the control group.

リンパ節重量及び試験濃度は、第三章、四章、七章のデータを用いた (^(a)Yamashita *et al.* (2015a) and ^(b)Yamashita *et al.* (2015b)) . EC3 値は、^(a)Nukada *et al.* (2013) と第七章の結果を用いた。

(本表 11 は、Fundamental Toxicological Sciences, 2016, Vol3, No. 1 に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

表 11 に示した EC1mg%と EC3 値の相関を図 17 に示した。図 17 から明らかなように、29 物質の EC1mg%と EC3 値の間に、両対数のグラフでは直線的な相関が認められた。この時の相関係数(R²)は 0.87 であり定量的な相関が認められた。

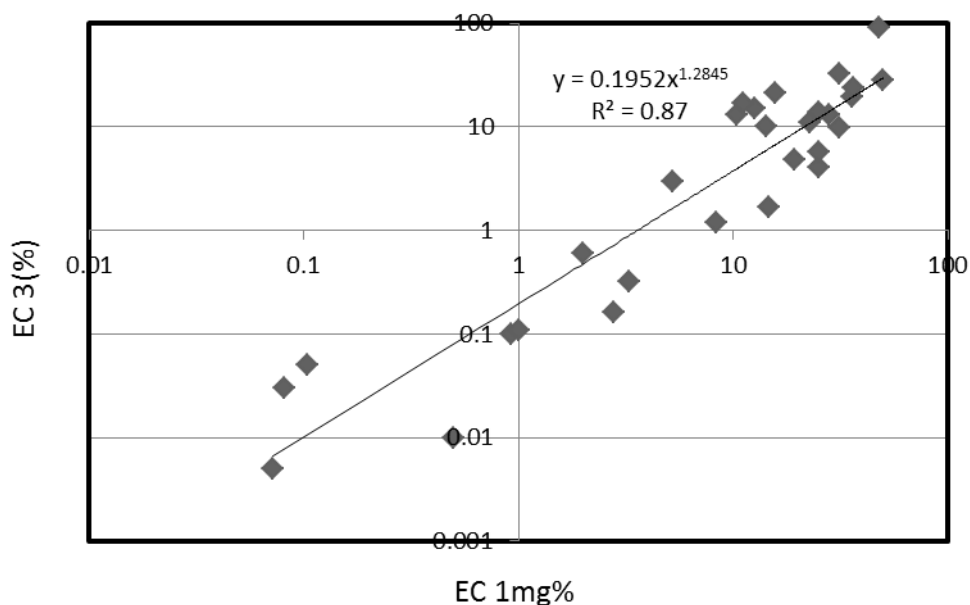


図 17 EC1mg% と EC3 値の相関

横軸は、LLNA:DAE 法の試験群と、コントロール群の左耳の重量の差と、暴露濃度から計算した。EC3 の値は、Nukada *et al.* (2013)から引用した。

X 軸は、EC1mg%、Y 軸は、EC3 値(%)を示す。

(本図 17 は、Fundamental Toxicological Sciences, 2016, Vol3, No. 1 に掲載の自著論文よりより許可を得て転載した。)

考察

LLNA 法が従来のモルモットを用いた試験法と比較し、より優れているとされるポイントとして以下があげられている。①動物に強制的に炎症を引き起こすことで、感作性物質に対する感受性を上げるアジュバントを用いないことから動物愛護の点で優れている、②試験に用いる動物数が少ない、③試験期間が短い、④試験結果の定量性に優れている、以上の4つである⁶¹⁾。

これらのポイントについて、LLNA 法と LLNA:DAE 法を比較した場合、①については、放射性物質のトリチウムチミジンの注射などを行わないことから、LLNA:DAE 法は、LLNA 法より更に動物愛護の点で優れていると考えられる。②に関しては、LLNA 法が、溶媒対照群、陽性対照群、試験群 3 濃度で、合計 20 匹の動物を必要とするのに対し、LLNA:DAE 法では 10 匹である。一方③に関しては、惹起相を導入したことにより、LLNA 法よりも 6 日間余分に時間がかかる。ここまでの比較から明らかなように、上記 3 点に関しては、LLNA:DAE 法は、試験期間が延びる以外は、LLNA 法と比べ、近年重視されている、動物愛護の観点からも優れていると考える。即ち 4 点目の④試験結果の定量性に関し、LLNA 法と同様の結果が得られれば、新規 LLNA 法としての有用性が更に高まると考えた。

そこで、本章では、LLNA:DAE 法の試験結果と化学物質の感作性強度の相関を 2 つの手法で検証した。

最初に、LLNA:DAE 法で、化学物質 1%を暴露したときに、左耳のリンパ節に引き起こされる惹起重量を、DILL value と定義し計算した結果を表 10 に示した。

その結果、DILL value を基に序列化した感作性強度と、LLNA 法の EC3 値を基に提案されている感作性クラス(C of SS Potential)は、LLNA 法で Moderate とされている 2-Mercaptobenzothiazole、NiSO₄ 及び Resorcinol が Weak に近い値を示した以外よく一致した。これらが一致しなかった理由としては、例えば Resorcinol に関しては、LLNA 法での評価にもばらつきがあり、このため今回の結果と一致しなかった可能性がある^{62,63)}。

2-Mercaptobenzothiazole と NiSO₄ に関しても同様のばらつきが原因である可能性はあるが、

今後更なる検討が必要である。

しかしながら、今回の 33 物資の分析において、2-Mercaptobenzothiazole、NiSO₄ 及び Resorcinol をのぞいて、DILL value の序列と LLNA 法の感作性強度のクラス分類はよく一致しており、これらの結果は、本試験方法により新規化学物質等の定性的な皮膚感作性強度の予測ができる可能性を示していると考えられた。

次に、より定量的な相関を明らかにすることを目的に、左側リンパ節に一定の惹起を引き起こすのに必要と想定される濃度の計算値と EC3 値の相関について検討した。複数の想定値について検討した結果、EC1mg%を採用した場合が、最も LLNA 法の EC3 値のクラス分けと一致した (表 11)。

更に、図 17 に示すように、LLNA 法で陽性の 29 物質の EC1mg%と EC3 値の間に、両対数のグラフにした場合には直線的な相関が認められた。一方、相関係数(R²)は 0.87 であり、十分高いとはいえない。この原因としては、LLNA 法の EC3 値が、化学物質の刺激性による非特異的増殖も含んで算出されるのに対し、LLNA:DAE 法では、純粋に感作性に基づく特異的リンパ球により引き起こされる増殖を評価するという違いに起因する可能性がある。また、感作性強度の強いものを見逃さないと言う観点からは、EC0.25mg%を採用した場合が、強度の感作性物質について最も一致率が高く、目的により使い分ける事が可能と考えられた (表 11)。

以上のように、LLNA 法で得られる EC3 値と、LLNA:DAE 法の結果から求めた感作性強度を示す指標は、定量的には完全に一致はしないが、一定の相関は認められることから、1 濃度の試験で行う LLNA:DAE 法の結果から、LLNA 法の EC3 値をある程度予測できることが明らかとなった。本検討結果は LLNA:DAE 法の新規皮膚感作性試験法としての有効性を更に示すものとする。

第六章 LLNA:DAE 法を用いた交差感作性検出に関する検討

本章における検討の背景と課題

第五章までに、LLNA:DAE 法が、惹起反応を用いる新規皮膚感作性試験となりうる可能性が強く示唆された。序論に述べたが、LLNA 法は化学物質の皮膚感作性を感作誘導段階で判定する。一方モルモットを用いる手法は惹起反応を検出することで感作性を判定する。この検出原理の違いにより、LLNA 法では、モルモットを用いた手法では評価が可能な、化学物質間の交差感作性の評価が不可能である。

まず始めに交差感作性について述べる。

化学物質の交差感作性とは、特定の化学物質、仮に A とすると、この A に感作されたヒトや動物が、構造に類似性がある特定の化学物質 B に対しても免疫系が反応し生体が応答することである。

このような場合、化学物質 B は、A に対し交差感作性を有すると判定される。この交差感作性の発現には、化学物質の構造的な類似性が重要であると考えられている。このような例は、たとえば、DNCB と DNFB、Hydroquinone(HQ)と Benzoquinone(BQ) や、食品にも含まれるクマリン類にも報告がある^{64,66)}。日常生活においては、交差感作が原因で、例えば薬物アレルギーや特定のアミノ酸配列が原因とされているラテックスフルーツ症候群と言われる一連の反応に認められることがあり、このような場合は特に注意をすることが必要であると言われている^{42,67)}。

次に本章の最初に述べた、試験方法の違いと、交差感作性評価の可否について詳細に述べる。LLNA 法では、序論の図 4 に示したように、化学物質の暴露による感作誘導期の局所のリンパ節の増殖反応を指標に感作性を評価する。さらに、試験開始から 6 日目にリンパ節を摘出することから、個体として、免疫的に十分な免疫システムの機能が整う前に試験が終了すると考えられる。従って、複数の化学物質を暴露し、その相互影響を評価することは原理

的に不可能である。一方モルモットを用いた試験法では、図 18 に示したように、あらかじめ感作処置を行ったモルモットに、十分な時間（感誘導から 21 日後以上）を置いたあとで、違う化学物質を用いて惹起処置を行い、そこで生じる皮膚反応を評価することで、2 種類の化学物質間の交差感作性の評価を行うことが可能である。

即ち、交差感作性を評価するには、特定の化学物質を用いて十分に感作された動物に対して、感作段階とは異なる化学物質を投与し、惹起反応の発現を検出できるか否かが試験方法として重要である。また、臨床応用としては、特定の化学物質に既に感作が成立している方が、どのような構造類似化学物質に対して反応するかを検討する場合もある。更に、試験法開発においては、明確に交差感作性が証明された組み合わせと、交差感作性が無いと考えられる化学物質の組み合わせで検証することが重要である。

既にこれまで述べたように、LLNA:DAE 法は、惹起相を含む試験法である。すなわち交差感作性を評価できる可能性がある。そこで本章では、LLNA:DAE 法の有用性を高めるべく、化学物質間の交差感作性評価の可能性について検証を試みた。交差感作性を有する組み合わせとして、DNFB と DNFB 及び HQ と BQ の組み合わせ、交差感作性を有さないと考えられる組み合わせとして、HCA と DNFB、SLS と Xylene の 4 組の組み合わせを用いて検証を行った。今回用いた 7 種類の化学物質の構造を図 19 に示した。

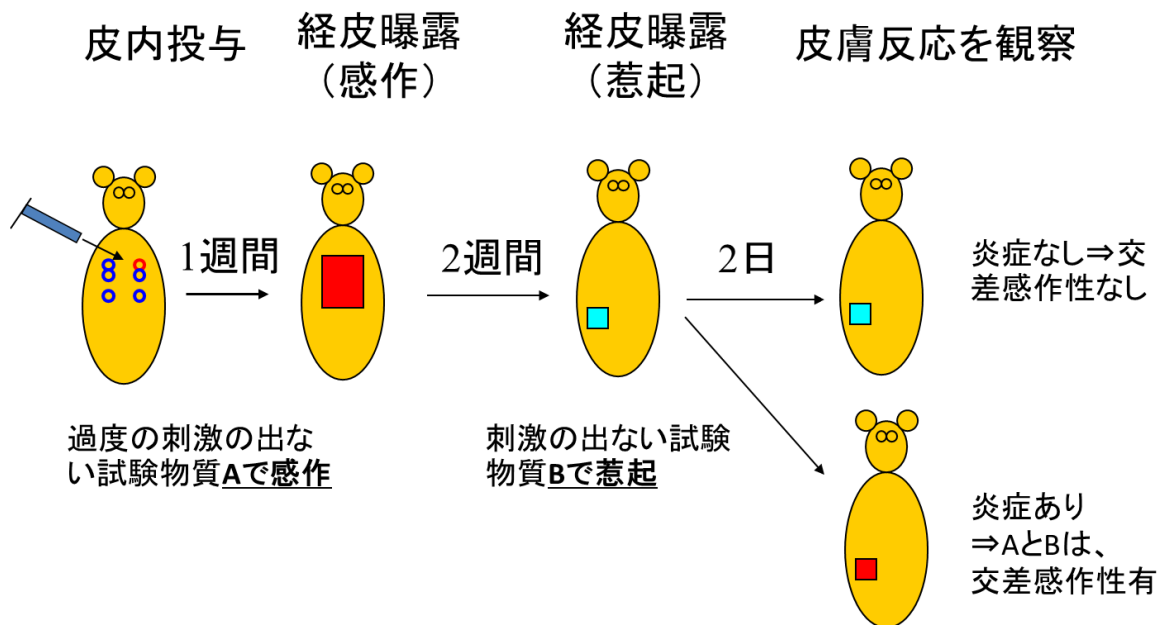
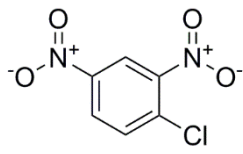


図 18 GPMT 法を用いた交差感作性試験方法

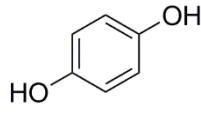
1. 試験物質（仮に A とする）A を OECD TG406 に準じて、背部皮内に注射する。
2. 1 週間後、A を Step1 の注射部位の上部に 24 時間閉塞暴露する。
3. 2 週間後、交差感作性を調べる試験物質 B を、刺激の出ない濃度で腹側部に貼付する。
4. 貼付後、24 時間後に B を洗い流し、一定時間後の皮膚反応を観察する。
5. B 貼付部位に紅斑、浮腫などの反応が認められた場合に、B は、A に対して交差感作性有とする。



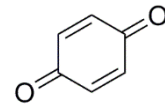
DNCB



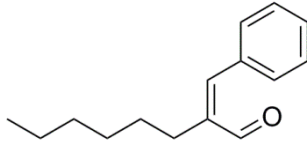
DNFB



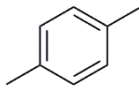
HQ



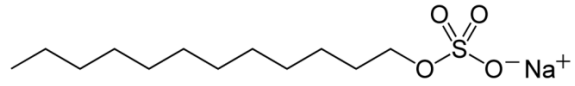
BQ



HCA



Xylene



SLS

図 19 交差感作性評価に用いた化学物質

検討結果

1. 感作性物質を用いた交差感作性検出の検討結果

3組の化学物質間の交差感作性を、図 20 に示した試験プロトコールを用いて評価した。

0.25% DNCB と 0.25%DNFB 及び 1% HQ と 1% BQ は相互に惹起反応を誘発した。即ちこれらの物質は相互に交差感作性を有すると判断できた。この結果はこれまでの知見と一致するものであった(図 21-a)。

一方 0.25%DNFB と 25%HCA 並びに、10%SLS と 100%Xylene は、相互に惹起反応を誘発しなかった。即ちこれらの物質間では、交差感作性が無いことが示唆された(21-b)。

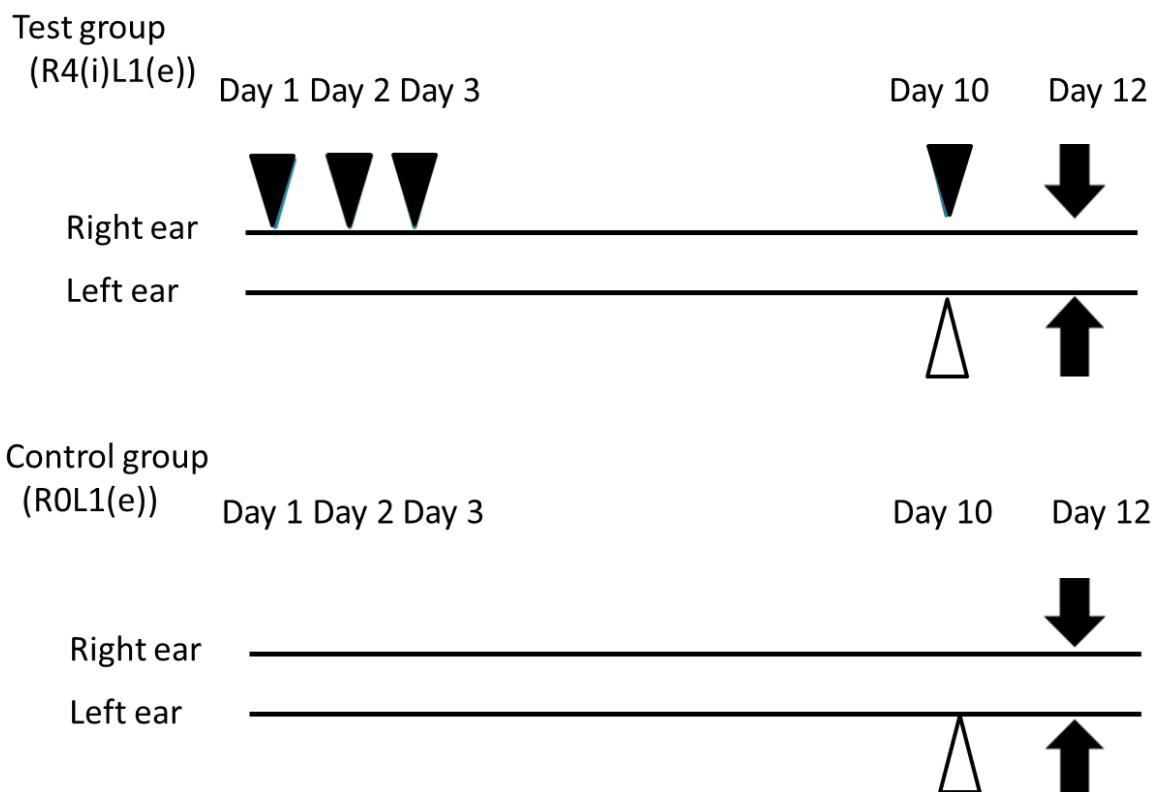


図 20 LLNA:DAE 法を応用した交差感作性試験プロトコール

試験群のマウスは、1 種類目の試験サンプルを 1、2、3 日目に右耳に投与し、10 日目は、右耳には 1 種類目の試験サンプルを、左耳は交差感作性を調べる 2 種類目のサンプルを塗布する。コントロール群のマウスは、10 日目に左耳に 2 種類目のサンプルを塗布する。いずれの群も 12 日目にリンパ節を摘出し、リンパ節重量を測定する。

略号; R4(i)L1(e)=右耳に 1 種類目の化学物質を 4 回投与し感作誘導(induction)し、左耳に 2 種類目の化学物質を投与し惹起(elicitation)する。R0L1(e)=左耳に 2 種類目の化学物質を投与する。

(本図 20 は、The Journal Toxicological Science, 2014, Vol39, No.1 に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

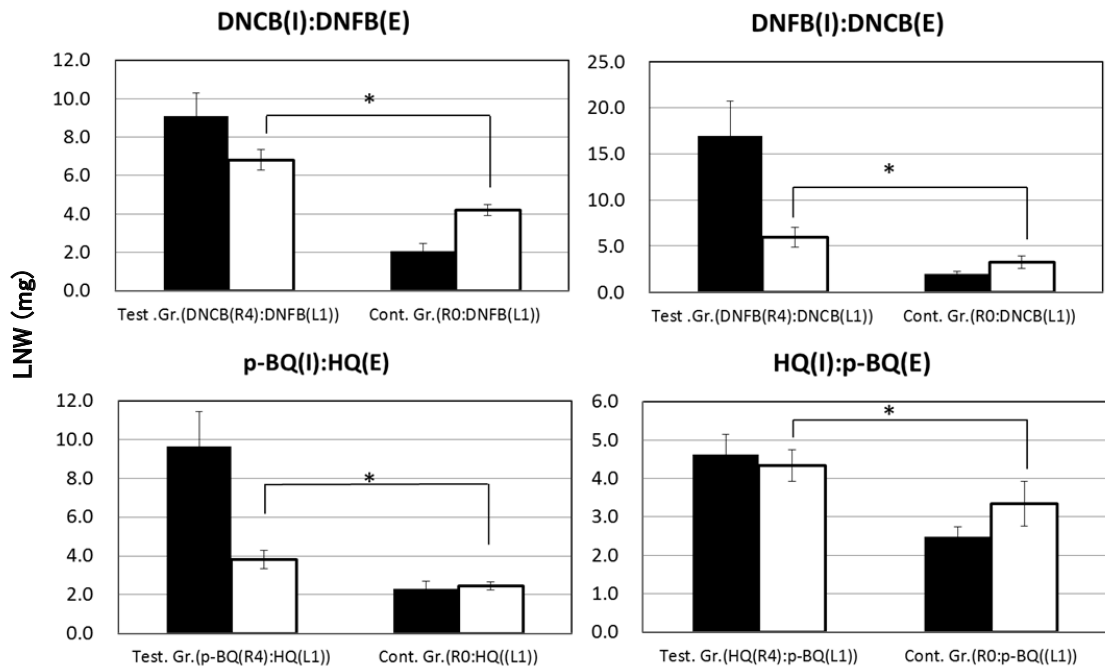


図 21-a 交差感作性陽性が予想される組み合わせの試験結果

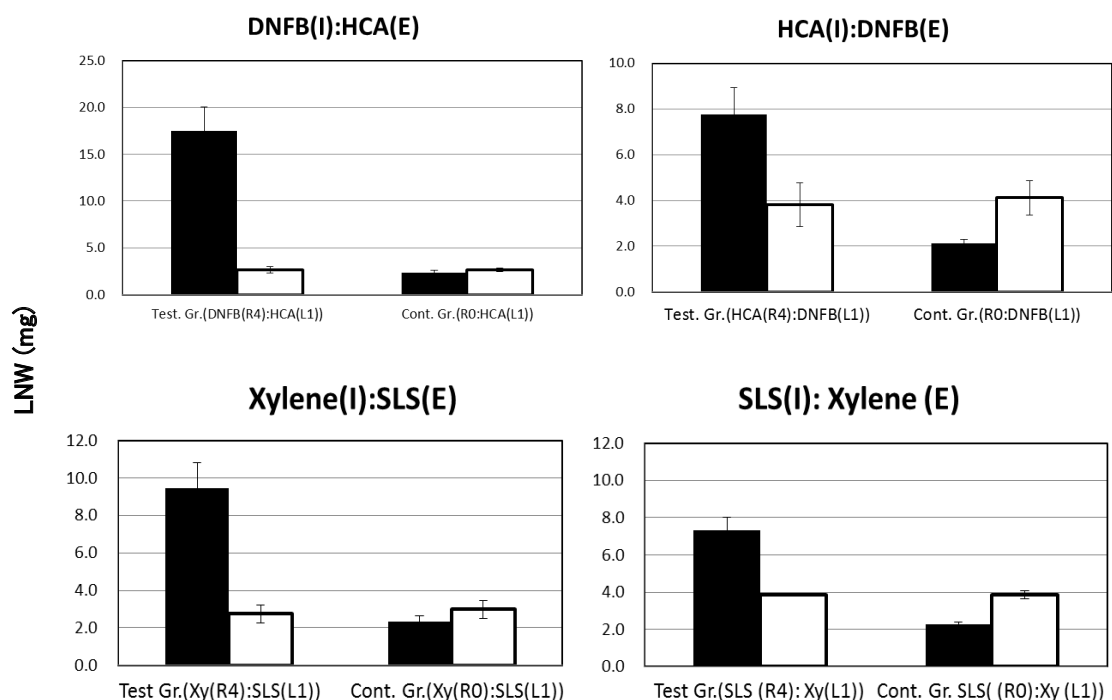


図 21-b 交差感作性陰性が予想される組み合わせの試験結果

グラフタイトルは、感作と惹起の組み合わせを示す。図 21-a の DNCB(I):DNFB(E)は、DNCB で感作し、DNFB で惹起する組み合わせを示す。X 軸の DNCB(R4):DNFB(L1)は、DNCB を右耳 4 回投与し左耳に DNFB を一回投与したことを示す。

試験群では、1 種類目の試験物質を、1、2、3、10 日目に投与し右耳に投与し、左耳には、10 日目に 2 種類目の試験物質を投与した。コントロール群では、10 日目に 2 種類目の試験物質を左耳に投与した。12 日目に、全てのマウスのリンパ節を摘出した。

黒カラムは右耳、白カラムは左耳のリンパ節重量を示し、各数値は、平均値±標準偏差(n=5)を示した。X 軸は、各投与群を示し、Y 軸はリンパ節重量を示した。

* は、試験群とコントロール群の左耳のリンパ節重量に、統計的有意差が認められたことを示す。統計学的優位差は、p131 に記載の手法で検定した。

略号：DNFB(I):HCA (E)=DNCB で感作し、HCA で惹起する組み合わせを示す。

DNFB(R4):HCA (L1)=DNFB を右耳に 4 回投与し、左耳に HCA を一回投与したことを示す。

(本図 21-a 及び 21-b は、The Journal Toxicological Science, 2014, Vol39, No.1 に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

考察

本章では、LLNA:DAE 法を用いて、交差感作性の評価が可能か否か検討した。

交差感作性は、本章の背景と課題に述べた、特定のアミノ酸配列が原因とされるラテックスアレルギー症候群に代表されるように、異なる原因物質、或いはその一部に共通する構造によって引き起こされると考えられる⁶⁷⁾。また、化学物質間の交差感作性は、化学物質のタンパク質と結合して抗原性を獲得する際に、その結合物の構造が類似している場合に発現されると考えられる。即ち、化学物質中の抗原決定基と呼ばれる構造の類似性が交差感作性の発現に重要であると考えられる。

今回評価した DNCB では、抗原決定基はジニトロフェニル基であり、クロルを放し、生体内タンパク質のリジンのアミノ基と結合することで、抗体認識部位即ちエピトープを形成し抗原性を発現すると考えられている⁶⁸⁻⁷⁰⁾。一方 DNCB と交差反応を示す DNFB もまた、ジニトロフェニル基を有しており、これが、DNCB と DNFB が相互に交差感作性を示した理由であると考えられる。一方 DNFB と交差感作性を示さなかった HCA は、フェニル基は有しているが、ジニトロ基は有していない。

また、今回試験した HQ と BQ は、それぞれ酸化、還元反応で相互変換するだけでなく、序論の図 2 に示した皮膚感作性の AOP の event3 に該当するペプチド結合性試験(DPRA)においても、いずれも類似の反応性を有することが報告されている。即ち、これらが生体内のタンパク質と結合した際には、同じエピトープを形成し、同じ抗原として図 21-a に示したように、DNCB と DNFB 及び BQ と HQ は相互に惹起反応を誘発したと推測される。即ちこれらの物質は相互に交差感作性を有すると判断でき、これはこれまでの知見と一致するものである。この結果は、LLNA:DAE 法で、感作性物質間の交差感作性が評価できる事を示す結果であると考えられる。

一方、図 21-b に示した、DNFB と HCA 並びに、SLS と Xylene は、相互に惹起反応を誘発しなかった。DNFB と HCA は、互いに皮膚感作性物質である。即ち本実験結果は、LLNA:DAE 法で規定した惹起反応が、それぞれの感作性物質に特異的な反応であることを示

す。また SLS と Xylene は、それぞれ皮膚刺激性を有し、第二章の図 7 に示した様にリンパ節の増殖を引き起こす。即ち本結果は、LLNA:DAE 法で規定した惹起反応が、刺激性による非特異的な反応で無いことを示す。

今後、弱い感作性物質間の交差感作性評価等、更なる検討が必要であるが、本章で得られた結果は、LLNA:DAE 法が GPMT 法等と同様に交差感作性評価に活用できる可能性を示唆する結果である。

第七章 LLNA:DAE 法及び in-vitro 法を用いた不飽和脂肪酸関連化合物の皮膚感作性評価

本章における検討の背景と課題

LLNA 法が 2002 年に OECD に収載され約 13 年が経過した。この間に、LLNA 法の結果を従来のモルモットやヒトの試験と比較した場合に、それぞれの試験結果が一致しない割合の高い化合物群があることが明らかとなってきた。その一例として、不飽和脂肪酸を含む一連の化合物が報告されている。Kreiling 等は、二重鎖を含む不飽和脂肪酸を中心に検討を行い、LLNA 法においては、GPMT 法やヒトの知見と比較して、より陽性反応が多く、かつ感作性強度が強くと判定される可能性がある事を報告した⁵¹⁾。また、その理由として、不飽和脂肪酸類の有する生理活性が一つの原因である事を述べている。しかしながら、これらの化合物が、LLNA 法で誘導したリンパ節増殖が、それぞれの物質に特異的なものであるか、非特異的なものであるかの結論は出ておらず、感作性に関しても明確な結論は出ていない。

そこで、本章においては、第六章までに確立した、LLNA:DAE 法及び交差感作性試験法並びに近年 OECD に新規皮膚感作性試験法として採択された DPRA 法を用い、表 12 に示した、Kreiling 等が報告した化合物の皮膚感作性を明らかにする事を目的に検討を行った。

本章で感作性評価に活用した DPRA 法は、Gerberick 等により開発された in-vitro 皮膚感作性試験法である。序論及び本章第一節に簡略に述べたが、DPRA 法においては、試験する化学物質と、システインもしくはリジンを含む 2 種類のペプチドとの結合性を指標に皮膚感作性を判定する。試験する化学物質を、それぞれのペプチドと 24 時間反応させ、それらのペプチドと化学物質の反応率の平均が 6.38%以上の場合に皮膚感作性が陽性と判定する。反応率は、ペプチドを HPLC により分析し、それぞれのペプチドピークの減少率で測定する。Urbish 等の最近の報告では、102 物質について DPRA 法の結果とヒトの結果を比較した場合の感度、特異度、陰性予測率、陽性予測率はそれぞれ、84%、84%、71%及び 92%と報告されており、非常に優れた方法の一つであると考えられる⁴¹⁾。本章において、DPRA 法を用い

た理由は、序論の図 2 に示したように、DPRA 法が皮膚感作性の初期のステップの化学物質とタンパク質の結合を模した方法であり、皮膚感作性発現のメカニズム解析において、極めてクリアな証拠を与える手法と考えたからである。また、GPMT 法、LLNA 法及びヒトの知見が一致しない理由を考察するに当たり、感作のメカニズム面から有意義な情報が得られると判断した。

本章においては、Kreiling 等が報告した、表 12 に示した不飽和脂肪酸を含む 8 種の化合物に関し、以下に示す 3 つの検討を行い、これらの皮膚感作性を明らかにした。

1. LLNA:DAE 法を用いた皮膚感作性評価
2. DPRA 法を用いた皮膚感作性評価
3. 交差感作性評価法を用いたリンパ節増殖反応の特異性の評価

検討結果

1. LLNA:DAE 法の結果

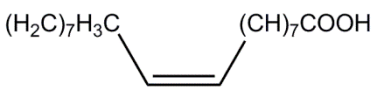
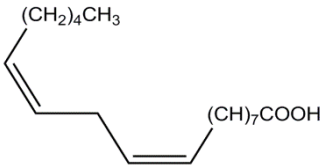
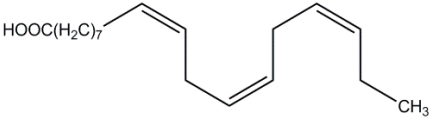
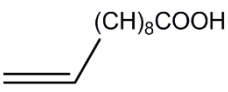
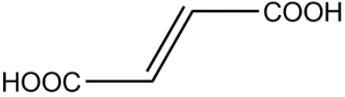
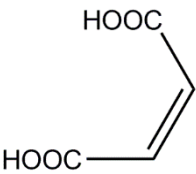
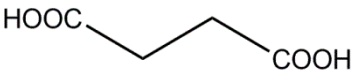
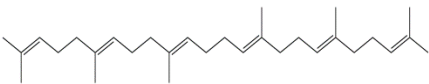
表 12 に示した 8 種類の化学物質の皮膚感作性を、第四章で確立したプロトコールを用いて評価した。5、10、25、50、100%における濃度設定試験の結果を表 13 に示した。今回の濃度設定試験において全身毒性は認められなかった。一方、25%(v/v)以上の Oleic acid、50%(v/v)の Linoleic acid 及び 10%以下の Maleic acid(w/v)において、耳介厚の 25%以上の増加が認められたため、過剰な刺激が生じたと判断した。

次に、本試験の結果を図 22 に示した。本試験の濃度は、予備試験の結果から、第四章の検討結果 4 に示したスキームに基づき、10%(v/v) Oleic acid、10%(v/v) Linoleic acid、10%(v/v) Linolenic acid、25%(v/v) Undecylenic acid、50%(w/v) Maleic acid、50%(w/v) Fumaric acid、50%(w/v) Succinic acid 及び 50%(v/v) Squalene に決定した。

Undecylenic acid、Oleic acid、Linoleic acid、Linolenic acid、及び Maleic acid は、惹起反応が認められた。他の 3 種には惹起反応は認められなかった。

感作性が示唆された 5 種について、第五章で定義した DILL value を算出した。その結果、Undecylenic acid は 0.03、Oleic acid は 0.07、Linoleic acid は、0.03、Linolenic acid は 0.03 及び Maleic acid は 0.04 であった。これらの結果は、これら 5 種が弱い皮膚感作性を有することを示す結果であった。

表 12 評価した不飽和脂肪酸を含む化合物と試験条件

Chemical	CAS RN	M.F.	Source	Purity (%)	Vehicle
Oleic acid	112-80-1		Acros Org.	97%	AOO
Linoleic acid	60-33-3		Acros Org.	99%	AOO
Linolenic acid	463-40-1		Acros Org.	99%	AOO
Undecylenic acid	112-38-9		Sigma-Aldrich	98%	AOO
Fumaric acid	110-17-8		Kanto	99.9%	DMSO
Maleic acid	110-16-7		Kanto	99%	DMSO
Succinic acid	110-15-6		Kanto	99.6%	DMSO
Squalene	111-02-4		Kanto	>98%	AOO

本章で使用した 8 種類の化学物質の CAS No.、構造、購入先、純度、LLNA:DAE 試験で溶解に用いた溶媒を示した。それぞれの溶媒は、既知の情報から選択した。

略号: CAS RN: Chemical Abstracts Service Registry Number; MF:分子構造; AOO:アセトン:オリーブオイル(4:1, v/v)溶媒; DMSO: Dimethyl sulfoxide; Sigma-Aldrich: Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA; Acros Org.: Acros Organics via Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA; Kanto: 関東化学工業株式会社, (本表 12 は、The Journal Toxicological Science, 2015, Vol40, No.6 に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

表 13 不飽和脂肪酸類を含む化合物の濃度設定試験の結果(LLNA:DAE 法)

Chemical	LNW	Dose of dose-finding study (%)				
		5.0	10.0	25.0	50.0	100
Oleic acid	LNW of RE (mg)	2.5	2.5	<u>5.9</u>	<u>4.4</u>	n.t.
	LNW of LE (mg)	2.4	2.6	3.2	2.8	n.t.
Linoleic acid	LNW of RE (mg)	2.2	2.8	5.2	<u>6.4</u>	n.t.
	LNW of LE (mg)	2.3	2.7	3.5	4.1	n.t.
Linolenic acid	LNW of RE (mg)	2.7	3.0	4.0	6.7	n.t.
	LNW of LE (mg)	2.7	2.4	3.5	4.2	n.t.
Undecylenic acid	LNW of RE (mg)	2.4	3.0	3.3	3.5	n.t.
	LNW of LE (mg)	2.0	2.6	2.4	2.8	n.t.
Fumaric acid	LNW of RE (mg)	3.2	3.4	3.9	4.5	n.t.
	LNW of LE (mg)	2.0	2.7	2.2	2.3	n.t.
Maleic acid	LNW of RE (mg)	<u>3.4</u>	<u>5.1</u>	6	11	n.t.
	LNW of LE (mg)	3.0	3.1	3.0	4.7	n.t.
Succinic acid	LNW of RE (mg)	2.5	2.7	2.7	2.8	n.t.
	LNW of LE (mg)	1.9	2.1	2.2	2.0	n.t.
Squalene	LNW of RE (mg)	n.t.	2.6	2.7	3.8	5.9
	LNW of LE (mg)	n.t.	2.6	2.5	3.0	2.7

本検討では、8物質を用いて予備試験を行った。各4段階の試験物質を各1匹のマウスに投与した。

1、2、3日目は右耳に、10日目は両耳に投与し、12日目にリンパ節を摘出した。紅斑、耳介腫脹、全身毒性は、OECD TG442Aの記載に従い実施した。

略号: LNW =リンパ節重量; LNW of RE (mg)=12日目の右側耳介リンパ節重量; LNW of LE (mg) =12日目の左側耳介リンパ節重量; n.t. = 試験実施せず

リンパ節重量のアンダーラインは、当該暴露濃度において、OECD TG429に規定した過度な皮膚刺激性が生じたことを示す。

(本表13は、The Journal Toxicological Science, 2015, Vol40, No.6に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

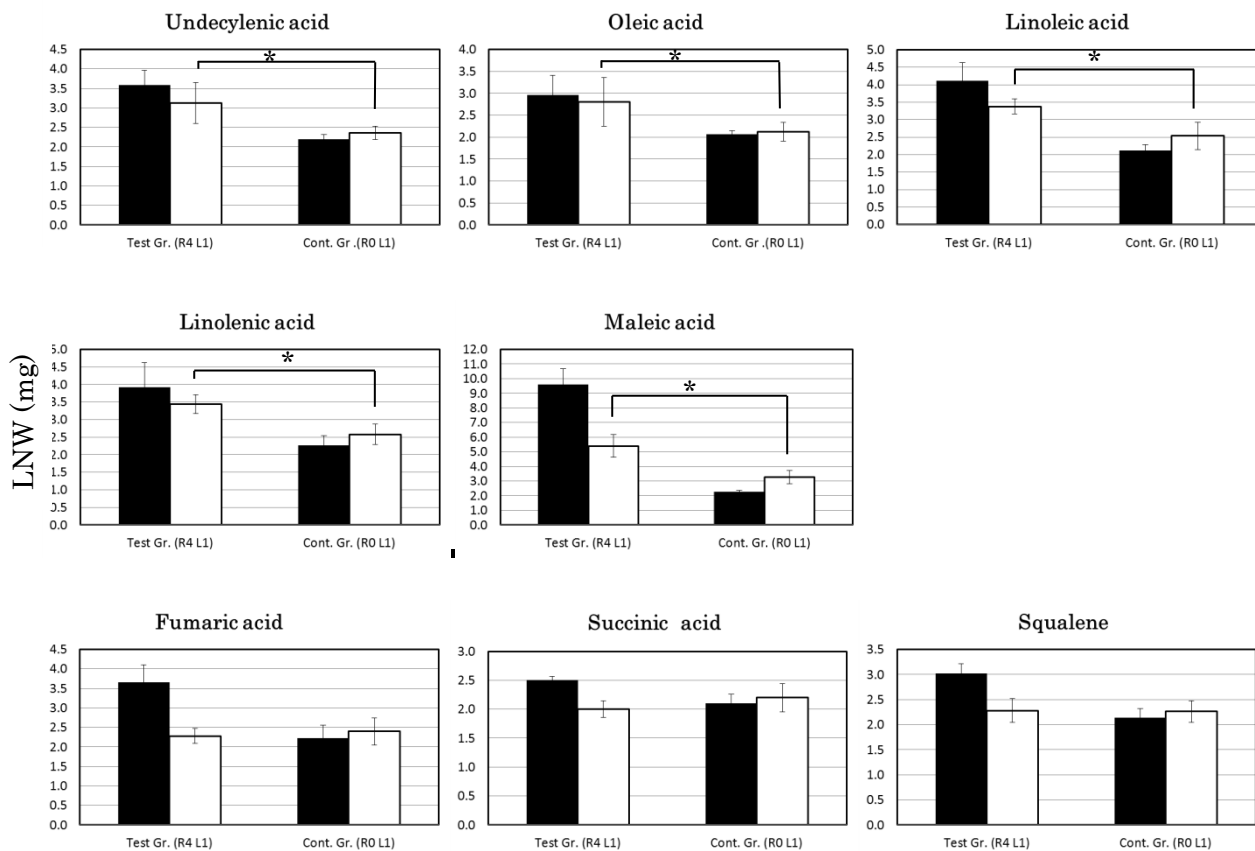


図 22 不飽和脂肪酸を含む化学物質の LLNA:DAE 法結果

LLNA:DAE 法において、Fumaric acid、 Succinic acid 及び Squalene は惹起反応が観察されず感作性は陰性、そのほかの 5 種類は明確な惹起反応が観察され、感作性は陽性と判定した。本検討において、試験群では、試験物質を 1、2、3 日目に右耳に投与し、10 日目には、両耳に投与した。コントロール群では、10 日目に試験物質を左耳に投与した。12 日目に、全てのマウスのリンパ節を摘出した。紅斑、耳介腫脹、全身毒性は、OECD TG442A の記載に従い評価した。黒カラムは右耳、白カラムは左耳のリンパ節重量を示し、各数値は、平均値±標準偏差(n=5)を示した。X 軸は、各投与群を示し、Y 軸はリンパ節重量を示した。

* は、試験群とコントロール群の左耳のリンパ節重量に、統計的有意差が認められたことを示す。統計学的優位差は、p131 に記載の手法で検定した。

略号：Test Gr.(R4L1)=試験群で、試験物質を右耳に 4 回、左耳に 1 回投与したことを示す。

Cont. Gr.(R0L1)=コントロール群で、試験物質を左耳に 1 回投与したことを示す。

2. DPRA 法によるペプチド反応性の検討結果

DPRA 法の結果を、表 14 に示した。ペプチド結合性を示したのは、Linoleic acid、Linolenic acid 及び Maleic acid であった。それぞれの反応率は、順に 23.1%、25.5%、29.8% であり、TG442C に示された基準によれば、いずれも中程度の反応性を示し、これらは皮膚感作性を有すると判定された。

表 14 不飽和脂肪酸を含む化合物の DPRA 法試験結果

Chemical	DPRA					
	M.W.	C-pep	K-pep	Ave.	Judgment	Vehicle
Undecylenic acid	184.28	0	0	0	N	ACN
Fumaric acid	116.07	0	3.3	1.7	N	DMSO:ACN = 1:9
Succinic acid	118.09	0	0.0	0.0	N	Water
Oleic acid	282.47	0	8.4	4.2	N	ACN
Linoleic acid	280.45	38.6	7.5	23.1	P	ACN
Linolenic acid	278.43	44.2	6.8	25.5	P	IPA
Maleic acid	116.07	59.6	0.0	29.8	P	Water
Squalene	410.73	0	8.1	4.1	N	IPA

略語: DPRA: Direct peptide reactivity assay; M.W.:分子量; C-pep: Ac-RFAACAA-COOH (Cys);

K-pep: Ac-RFAAKAA-COOH (Lys); Ave.: C-pep と K-pep のそれぞれの反応率の平均値;

Judgment: 判定; N:陰性; P:陽性; ACN: Acetonitrile; DMSO: Dimethyl sulfoxide; IPA :

Isopropyl alcohol; DMSO:ACN = 1:9 = DMSO (1 vol.):ACN (9 vol.).

(本表 14 は、The Journal Toxicological Science, 2015, Vol40, No.6 に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

3. 交差感作性試験法を用いた特異性の検討結果

本試験で Oleic acid、Linoleic acid、Linolenic acid、Undecylenic acid 及び Maleic acid に惹起反応が認められた。この惹起反応に化学物質特異性があるか否かを検証する目的で、Oleic acid、Linolenic acid、Undecylenic acid 及び Maleic acid を用いて、相互に交差感作性試験を実施した。それぞれが相互に交差感作性を示さなければ、本試験で認められた惹起反応が、不飽和結合を含む化合物に共通した生理活性作用で引き起こされているのではなく、それぞれの化学物質に特異的な反応であることの証明になると考えたからである。交差感作性の試験結果を、図 23 に示した。Maleic acid と Linolenic acid 及び、Undecylenic acid と Oleic acid の組み合わせによる LLNA:DAE 試験の結果、いずれの見合わせにおいても惹起反応が認められず、これらの 2 組は相互に交差感作性を有さないことが確認された。即ち、本試験において認められた惹起反応は、不飽和脂肪酸を含む化合物に共通するメカニズムによるものではなく、これらの化学物質が、それぞれに特異的なリンパ節増殖反応を誘導することが確認された。

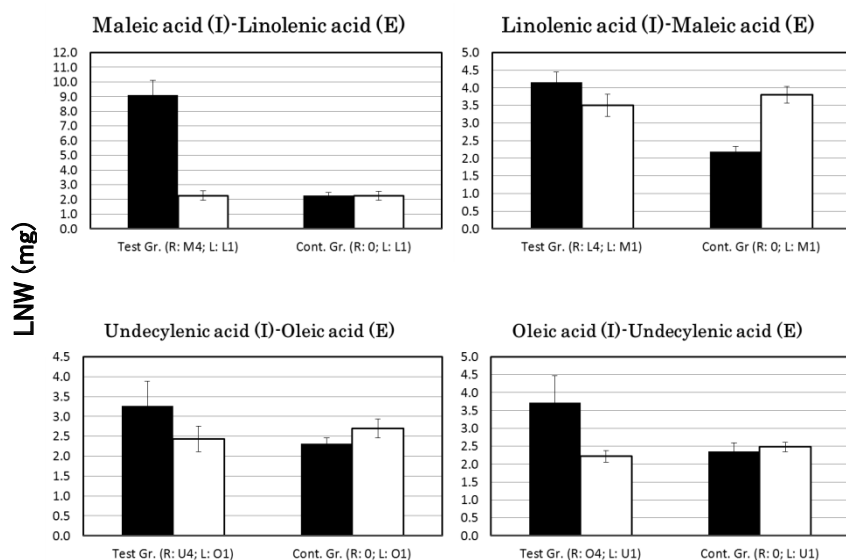


図 23 交差感作性試験による特異性の確認

今回の組み合わせにおいて、交差感作性は認められなかった。

黒カラムは右耳、白カラムは左耳のリンパ節重量を示し、各数値は、平均値±標準偏差(n=5)を示した。X軸は、各投与群を示し、Y軸はリンパ節重量を示した。

略号：Maleic acid(I): Linolenic acid(E)= Maleic acid で感作し、Linolenic acid で惹起する組み合わせを示す。

Test Gr.(R: M4; L: L1) =試験群は、 Maleic acid を右耳に 4 回投与し、左耳に Linolenic acid を一回投与したことを示す。

Cont. Gr.(R: 0; L: L1)=コントロール群は、左耳に Linolenic acid を一回投与したことを示す。

(本図 23 は、The Journal Toxicological Science, 2015, Vol40, No.6 に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

考察

LLNA 法の結果と、モルモットの試験結果及びヒトの知見を比較した場合に、それぞれの試験結果が一致しない化合物群として、Kreiling 等は不飽和脂肪酸を含む化合物の結果を報告している。その結果、LLNA 法では、GPMT 法やヒトの知見と比較して、より陽性反応が多く、かつ感作性強度が強くと判定される可能性がある事を報告した⁵¹⁾。

そこで、本章においては、第六章までに確立した、LLNA:DAE 法及び交差感作性試験法並びに近年 OECD に新規皮膚感作性試験法として採択された DPRA 法を用い、これらの化合物の皮膚感作性を明らかにすることを目的に検討を行った。

本章で得た LLNA:DAE 法の結果及び DPRA 法の結果と Kreiling 等が報告した GPMT 法及び LLNA 法の結果をまとめて表 15 に示した。Kreiling 等の報告によれば、今回評価した 8 種類の中で、GPMT で明確な陽性反応を示したのは Undecylenic acid、Linoleic acid、Squalene の 3 種であった。一方 LLNA 法では、Fumaric acid と Succinic acid 以外の Undecylenic acid、Oleic acid、Linoleic acid、Linolenic acid、Squalene、Maleic acid は陽性であった。これらの内、Linolenic acid と Maleic acid は LLNA 法で中程度の感作性を示した。これらの内ヒトで症例報告があるのは Undecylenic acid のみであり、LLNA 法よりも GPMT 法の方が、これらの化合物の評価には適している可能性がある^{と結論している^{51,71)}}。序論及び第三章に述べたが、LLNA 法は、GPMT 法と異なり、感作誘導段階のリンパ節の増殖を感作性の有無と強度の指標にしており、このリンパ節の増殖には、非特異的なリンパ節の増殖と免疫機序による感作性物質特異的な増殖の 2 つが混在していることが明らかとなっている。

仮にこれら脂肪酸類が、LLNA 法において非特異的なリンパ節の増殖のみを引き起こしているのであれば、上記 LLNA 法の結果と GPMT 法の結果、並びにヒトの知見との相違は理論的に説明できる。

脂肪酸類が引き起こす、非特異的なリンパ節の増殖誘導メカニズムにはいくつかの可能性が報告されている。例えば、Pappinen は、Oleic acid がラットのケラチノサイトから炎症性サイトカインの一種であるインターロイキン-1 α (IL-1 α)を誘導することを報告している⁷²⁾。また Boelsmaha 等は、

Oleic acid がヒトのケラチノサイトに Interleukin 1 α (IL-1 α)の m-RNA の発現を誘導することを報告している⁷³⁾。Cumberbach 等の報告によれば、IL-1 α が表皮のランゲルハンス細胞の活性化と移動を引き起こすことが報告されており、これは、Oleic acid が、IL-1 α の誘導を解して、リンパ節の非免疫的な増殖を直接誘導することを示唆する⁷⁴⁾。

IL-1 α の関与するメカニズムに加え、いくつかの脂肪酸が、マウスの耳介に Tymic stromal lymphoprotein (TSLP) を誘導することも知られている⁷⁵⁾。TSLP は、Interleukin -7(IL-7)に類似したサイトカインで、皮膚の炎症と、リンパ節の増殖誘導を引き起こすことが知られている⁷⁶⁾。また、TSLP の誘導は上皮角質層の物理的損傷だけでも誘導されることも知られている⁷⁷⁾。これらの報告は、今回評価した脂肪酸が、非免疫的機序でリンパ節の増殖を誘導する可能性を示唆するものである。

一方、LLNA:DAE 法において Fumaric acid、 Succinic acid 及び Squalene は感作性陰性、その他 5 種類(Undecylenic acid, Oleic acid, Linoleic acid, Linolenic acid, Maleic acid)の感作性は陽性判定された。またそれぞれの DILL value は、0.03 から 0.07 の間であり、これらの結果は、これら 5 種がいずれも弱い感作性を有することを示唆する結果である。LLNA 法の結果から、Linolenic acid、Maleic acid 及び Squalene は中程度の感作性であると判断できることから、明らかに LLNA:DAE 法の方が感作性強度が低く評価された⁵¹⁾。

この感作性強度の違いは、以下のように理解できる。LLNA:DAE 法では、化学物質によって引き起こされる感作性物質特異的な増殖と、非特異的なリンパ節の増殖の 2 つを識別できる。即ち、Oleic acid 等が有すると考えられる非特異的なリンパ節増殖活性が評価に影響しないと考えられる。これが、LLNA:DAE 法の結果が、LLNA 法の結果から示される感作性強度よりも弱い傾向を示す理由であると考ええる。

表 13 に示したように、Linoleic acid、 Linolenic acid 及び Maleic acid は、DPRA 法陽性であった。それぞれの反応率は、順に 23.1%、25.5%、29.8%であり、いずれも中程度の反応性をしめした。皮膚感作性の AOP(図 2)において、DPRA 法は最初のステップであるハプテン形成を模した試験であり、化学物質の感作性の発現には極めて重要なステップの試験で

ある。Urbish 等の報告によれば、DPRA 法のヒトの結果に対する陽性予測率は 92%であり、これは、DPRA で陽性と判定された場合、その 92%がヒトにおいても感作性を示すことが予想されることを示す結果である。これら 3 種は LLNA:DAE 法でも陽性であり、in-vivo、in-vitro のいずれでも陽性であるということは、これらが感作性物質であることを強く示唆する結果であると考えられる。

そこで、LLNA:DAE 法で認められた惹起反応に、それぞれの化学物質特異性がある事を証明する為に、交差感作性試験を行った。結果は図 23 に示した。交差感作性を評価する組み合わせを選択する上で、第一に真の交差反応を避けるために、炭素鎖の数、二重結合の位置を考慮し、構造的類似性が少ないと考えられる物質を選択した。その上で、それぞれの組み合わせは、Linolenic acid と Maleic acid については、DPRA 法で陽性であり、それぞれ感作性を有する可能性が高いことから選択した。Undecylenic acid と Oleic acid については、Undecylenic acid はヒトでのアレルギーの報告があり⁷¹⁾、Oleic acid は、炎症性サイトカインである interleukin-1 alpha (IL-1 α)を誘導することが知られていることから選択した⁷²⁾。

Maleic acid で感作し、Linolenic acid で惹起した組み合わせでは、Maleic acid を投与した右耳のリンパ節重量は約 9mg に増加した。この数値は、Maleic acid の本試験の結果と近似しており、感作誘導は十分に行われたことを意味する。しかし Linolenic acid による惹起反応は認められなかった。一方 Linolenic acid で感作し、Maleic acid で惹起した組み合わせでは、Maleic acid で惹起した左耳のリンパ節重量は約 3.5mg に達した。第三章で述べたが、化学物質の耳介への暴露において、暴露後最初に起こるのは非特異的増殖である。このことから、Maleic acid の単回投与によって、左耳に十分な非特異的リンパ節増殖が起こっていることが示唆された。しかしながら、左右のリンパ節重量に差は認められなかった。このことは、Linolenic acid で感作したマウスにおいては、Maleic acid を用いた惹起処置によって、非特異的なリンパ節の増殖以外生じなかったことになる。上記の実験結果は、Maleic acid の本試験で認められた左耳のリンパ節重量が、非特異的増殖に加えて、特異的な増殖により生じたことの証明となると考える。

同様に、Undecylenic acid と Oleic acid の組み合わせにおいても、相互に惹起反応は認められなかった。それぞれの LLNA:DAE 法において認められた惹起反応は、不飽和脂肪酸を含む化合物に共通する、例えば IL-1 α 誘導などの生理活性メカニズムによるものではなく、それぞれの物質に特異的な反応であることが確認された。

以上の結果から、今回試験した 8 種類の化合物のうち、Undecylenic acid, Oleic acid, Linoleic acid, Linolenic acid, Maleic acid の 5 種類は感作性物質であると結論した。一方これらの物質が、Undecylenic acid を除いて、ヒトでの症例が見つけられなかった事に関しては、これらの物質の実際の使用状況、即ち濃度、頻度や、これらが食品等にも含まれ、経皮だけでなく、経口的に暴露されている事が影響している可能性があり、これらのリスクについては更なる研究が必要であると考えられる。

表 15 不飽和脂肪酸を含む化合物群の試験結果のまとめ

Chemical	Test method and results				
	Current results			Previous results	
	LLNA:DAE		DPRA/ reactivity	LLNA (EC3)/ potency	GPMT (%)/ potency
	P or N	DILL value/ potency			
Undecylenic acid	P	0.03/W	N	19.4% ^(a) /W	40 ^(a) /M
Fumaric acid	N	0	N	N.A. ^(a)	0 ^(a)
Succinic acid	N	0	N	N.A. ^(a)	0 ^(a)
Oleic acid	P	0.07/W	N	10.5% ^(a) /W	20 ^(a) /W
Linoleic acid	P	0.03/W	M	14.1% ^(a) /W	- ^(a)
Linolenic acid	P	0.03/W	M	9.8% ^(a) /M	- ^(a)
Maleic acid	P	0.04/W	M	4.1% ^(a) /M	0 ^(a)
Squalene	N	0	N	6.1% ^(a) /M	20 ^(a) /W

略号: P:Positive; N:Negative; / W: 各試験法の判定基準で弱い感作性物質; /M: 各試験法の判定基準で中程度の感作性物質; M:DPRA法において中程度の反応性である事を示す; GPMT (%): GPMT法の感作率, 40% =10匹のモルモットのうち, 4匹に惹起が認められた事を示す; -: 試験が完了しなかった、もしくはデータが不十分で感作率が求められなかったことを示す; N.A.: LLNA法で、EC3が計算できなかった。本表 11に”^(a)”で区別したGPMT法の感作率、LLNA 法のEC3値は、Kreiling’s (Kreiling *et al.*, 2008)らの報告から計算して求めた。

(本表15は、The Journal Toxicological Science, 2015, Vol40, No.6に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

第八章 LLNA:DAE 法を用いた界面活性剤のアレルギー誘発性評価

本章における検討の背景と課題

第七章で、LLNA 法の結果と GPMT 法の結果が一致しない傾向がある化合物群のひとつである不飽和脂肪酸に関する検討結果を報告し、評価した 8 種類の内 Undecylenic acid, Oleic acid, Linoleic acid, Linolenic acid, Maleic acid の 5 種類が皮膚感作性を有することを報告した。

不飽和脂肪酸類と同様に、LLNA 法において偽陽性を示す物質が多い化学物質群として、界面活性剤が報告されている。代表的な界面活性剤の一種である Sodium Lauryl Sulfate (SLS)は、LLNA 及び我々の開発した LLNA:DA 法において、明確に陽性反応を示す²³⁾。一方 GPMT 法では陰性である²¹⁾。SLS に関しては、その皮膚感作性に関し多くの検討がなされ、その結果皮膚感作性は無く、LLNA で認められる陽性反応は、偽陽性であると結論されている。

また、同じく界面活性剤である塩化ベンザルコニウム(BzCl)は、LLNA 法で陰性と結論している報告もあるが⁷⁸⁾、一方で、我々の開発した LLNA:DA 法では陽性の結果を示す²⁴⁾。BzCl に関し、Basketter らは、ヒトにおけるアレルギー発症頻度は低く、稀に皮膚感作を起す化合物群に分類している⁷⁹⁾。

また、これらの界面活性剤は、第七章で用いた DPRA 法においては、SLS は、陽性と陰性の両方の報告があり、BzCl は陰性であると報告されている^{80,81)}。この結果は、DNCB などの感作性物質のように、明確なハプテンを形成しない可能性を示す。

今回、これら 2 種類の界面活性剤の感作性に関し、ヒトにおける症例を調査した。その結果、本邦において BzCl が、眼科領域で明確にアレルギーを誘発している症例報告を複数確認した^{82,83)}。また、SLS に関しては、海外の事例であり、症例数は BzCl に及ばないが、歯科領域でのアレルギー誘発の報告を複数見出した^{84,85)}。即ちこれらの化合物は、明確な皮膚感作性は有しないが、生体に何らかのアレルギーを誘発する可能性が示唆された。

そこで、本章では、2つの界面活性剤のアレルギー誘発性を明らかにする事を目的に以下に示す、3つの検討を行った。

1. LLNA:DAE法による評価:BzCl及びSLSがLLNA法で陽性反応を示す理由として、それらの有する皮膚刺激性に起因する非特異的なリンパ節増殖が原因であると言われている。そこでLLNA:DAE法を用いて、刺激性と皮膚感作性の識別を試みた。
2. 惹起濃度依存性の検討:一般的に、一度感作が成立した個体では、刺激の出ない濃度で惹起反応が生じる。そこでBzCl及びSLSの惹起の濃度依存性について検討した。陽性対照としてはDNCBを用いた。
3. リンパ節増殖活性の物質特異性の検討:BzClとSLSは共に界面活性剤である。従って、これらによって誘導されるリンパ節増殖が、界面活性剤に共通したメカニズムによって引き起こされている可能性もある。そこでこれらについて相互に交差感作性の評価を行い、リンパ節増殖活性の物質特異性を確認した。

検討結果

1. LLNA:DAE 法による評価

LLNA:DAE 法を用いて、SLS と BzCl の評価を行った。評価に用いる濃度は、LLNA 法や LLNA:DA 法において、明確なリンパ節増殖を引き起こす濃度を選択した。

10% SLS 及び 2.5% BzCl を試験した結果、いずれも惹起反応が認められた (図 24)。この結果から、SLS 及び BzCl が、マウスにおいて惹起反応を誘導することが明らかとなった。

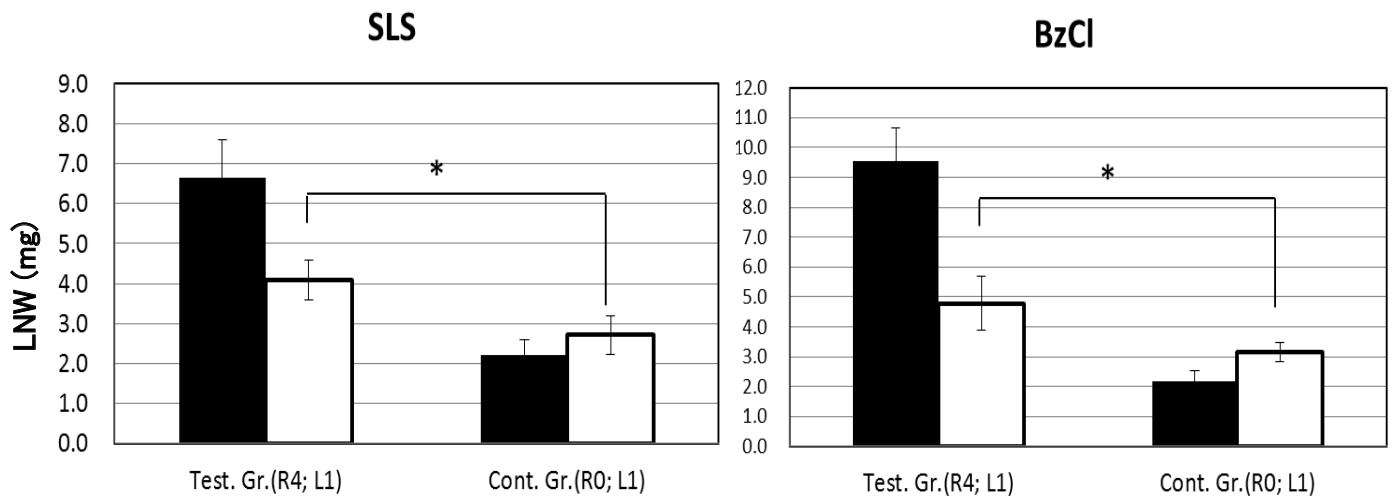


図 24 SLS 及び BzCl を用いた LLNA:DAE 試験結果

試験群では、試験物質(10%SLS あるいは 2.5%BzCl)を、1、2、3 日目に右耳に投与し、10 日目には、両耳に投与した。コントロール群では、10 日目に試験物質(10%SLS あるいは 2.5%BzCl)を左耳に投与した。12 日目に、全てのマウスのリンパ節を摘出した。

黒カラムは右耳、白カラムは左耳のリンパ節重量を示し、各数値は、平均値±標準偏差(n=5)を示した。

X 軸は、各投与群を示し、Y 軸はリンパ節重量を示した。

* は、試験群とコントロール群の左耳のリンパ節重量に、統計的有意差が認められたことを示す。

統計学的優位差に関しては、p131 に記載の手法で検定した。

略号：Test Gr. (R4L1)=試験群で、試験物質を右耳に 4 回、左耳 1 回投与したことを示す。

Cont Gr. (R0L1)=コントロール群で、試験物質を左耳に 1 回投与したことを示す。

(本図 24 は、日本職業・環境アレルギー学会雑誌,2016, 23 巻 2 号に掲載の自著論文に掲載のデータを基に作成した。)

2. 惹起の濃度依存性の検討

SLS 及び BzCl が引き起こす惹起反応の濃度依存性を明らかにする目的で、感作濃度と惹起濃度を変更する検討を行った。

10% SLS で感作し、1% SLS で惹起した場合には、惹起反応は検出されなかった。また、1%濃度で感作し、1%濃度で惹起した場合も惹起反応は検出されなかった (図 25)。

同様に、2.5% BzCl で感作し、0.25% BzCl で惹起した場合には、惹起反応は検出されなかった。また、0.25%濃度で感作し、0.25%濃度で惹起した場合も惹起反応は検出されなかった(図 26)。

一方、代表的な感作性物質である DNCB を用いた場合には、0.25%で感作し、0.025%で惹起した場合にも惹起反応が検出された。しかし、0.025%で感作及び惹起を行った場合には、惹起反応は認められなかった(図 27)。

また、惹起に用いた 1% SLS、0.25 % BzCl、0.025% DNCB は、単回暴露において有意なリンパ節増殖を引き起こさないことが、それぞれのコントロール群の左耳の重量との比較から示された(図 25、26、27)。

今回の試験条件において、化合物により試験濃度は異なっているが、単回暴露では刺激の出ない濃度で惹起誘発を行う試験が実施出来たと考えられる。しかしながら、本試験条件下で、低濃度暴露で惹起が認められたのは DNCB のみであった。

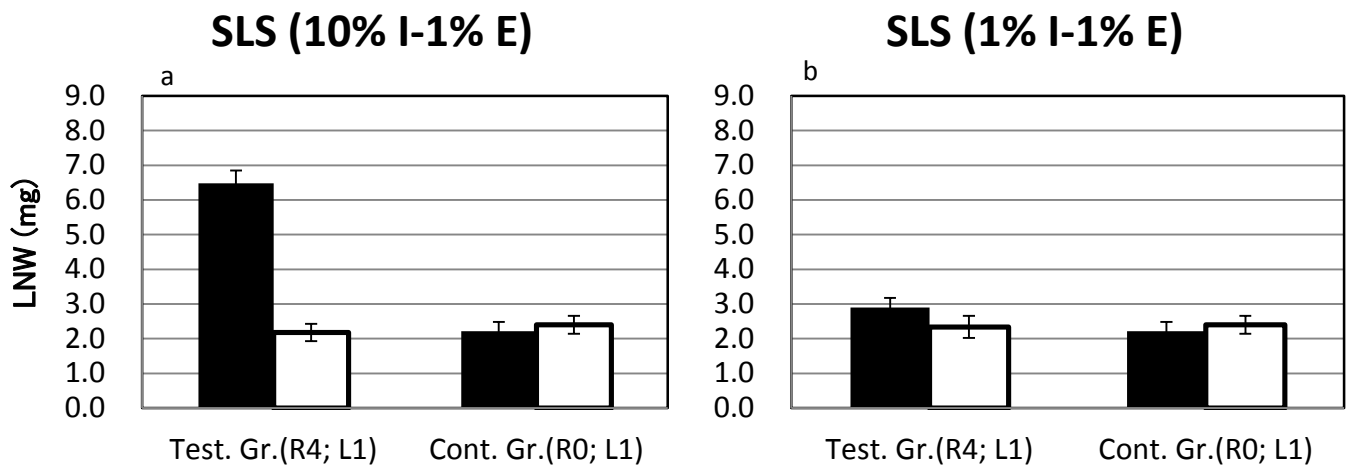


図 25 感作と惹起濃度を変えた SLS の試験

試験群では、10% SLS(図 a) もしくは 1% SLS(図 b)を、1、2、3、10 日目に右耳に投与し、10 日目には 1% SLS を左耳に投与した。コントロール群では、10 日目に 1% SLS を左耳に投与した。12 日目に、全てのマウスのリンパ節を摘出した。黒カラムは右耳、白カラムは左耳のリンパ節重量を示し、各数値は、平均値±標準偏差(n=5)を示した。X 軸は、各投与群を示し、Y 軸はリンパ節重量を示した。

略号：Test Gr.(R4; L1)=試験群で、試験物質を右耳に 4 回、左耳 1 回投与したことを示す。

Cont Gr. (R0; L1)=コントロール群で、試験物質を左耳に 1 回投与したことを示す。

(本図 25 は、日本職業・環境アレルギー学会雑誌,2016, 23 巻 2 号に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

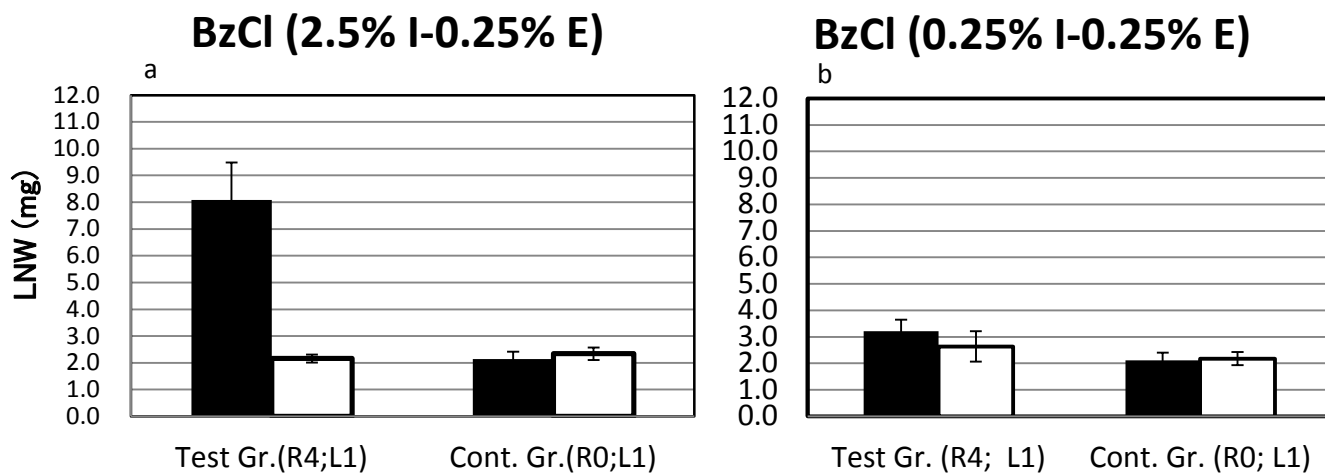


図 26 感作と惹起濃度を変えた BzCl の試験

試験群では、2.5% BzCl(図 a)もしくは 0.25% BzCl(図 b) を、1、2、3 日目に投与し、10 日目には、0.25% BzCl を左耳に投与した。コントロール群では、10 日目に 0.25% BzCl を左耳に投与した。12 日目に、全てのマウスのリンパ節を摘出した。黒カラムは右耳、白カラムは左耳のリンパ節重量を示し、各数値は、平均値±標準偏差(n=5)を示した。X 軸は、各投与群を示し、Y 軸はリンパ節重量を示した。

略号:Test Gr.(R4; L1)=試験群で、試験物質を右耳に 4 回、左耳 1 回投与したことを示す。

Cont. Gr. (R0; L1)=コントロール群で、試験物質を左耳に 1 回投与したことを示す。

(本図 26 は、日本職業・環境アレルギー学会雑誌,2016, 23 巻 2 号に掲載の自著論文に掲載のデータを基に作成した。)

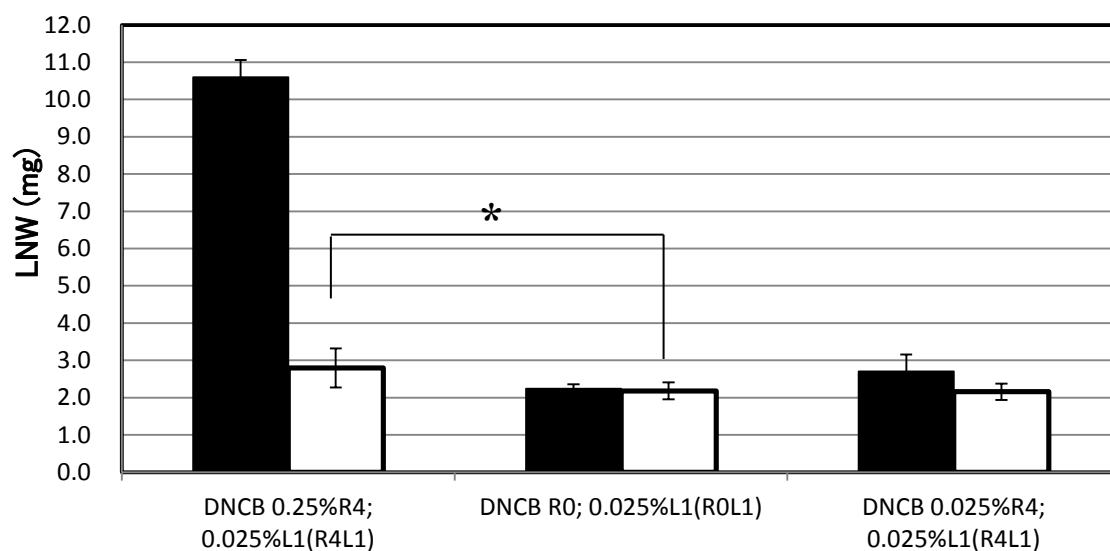


図 27 感作と惹起濃度を変えた DNCB の試験

左端の群では、0.25% DNCB を、右耳に 1、2、3、10 日目に投与し、10 日目に、左耳に 0.025% DNCB を投与した。右端の群では、0.025% DNCB を、右耳に 1、2、3 日目に投与し、10 日目に、両耳に 0.025% DNCB を投与した。中央の群では、0.025% DNCB を 10 日目に左耳に投与した。全ての群で 12 日目に、マウスのリンパ節を摘出した。黒カラムは右耳、白カラムは左耳のリンパ節重量を示し、各数値は、平均値±標準偏差(n=5)を示した。X 軸は、各投与群を示し、Y 軸はリンパ節重量を示した。* は、試験群とコントロール群の左耳のリンパ節重量に、統計的有意差が認められたことを示す。統計学的優位差に関しては、p131 に記載の手法で検定した。

略号 : DNCB 0.25%R4;0.025%L1(R4L1) =0.25%DNCB を右耳に 4 回投与し、左耳に 0.025% DNCB を 1 回投与したことを示す。

(本図 27 は、日本職業・環境アレルギー学会雑誌,2016, 23 巻 2 号に掲載の自著論文より許可を得て転載した。)

3. リンパ節増殖活性の物質特異性の検討

本章 1 及び 2 の検討で、SLS 及び BzCl が、マウスにおいて惹起反応を引き起こし、また、その惹起反応の誘導には、十分な刺激を生じる濃度を用いることの必要性が示唆された。本検討では、SLS 及び BzCl で認められた惹起反応が、界面活性剤に共通するメカニズムか、それともそれぞれの物質に対する特異的な反応か明らかにするために、リンパ節増殖活性に基づいた交差感作性試験を行った。

10% SLS と 2.5% BzCl を用いた交差感作性試験の結果を図 28 に示した。SLS と BzCl は交差感作性を示さなかった。それぞれを暴露した試験群の右耳は、それぞれ、7.1mg 及び 9.3mg に増殖しており、十分な感作が生じていることが示唆された。一方いずれの場合も、試験群の左耳と、コントロール群の左耳に統計的有意差は認められず、惹起は誘発されなかった。さらに、試験群の左耳とコントロール群の左耳のリンパ節重量は、いずれの場合もコントロール群の右耳、即ちナイーブな状態のリンパ節に比較し増加しており、十分な刺激が生じる濃度であることが示唆された。

本結果から、SLS と BzCl で認められた惹起反応には特異性がある事が確認された。

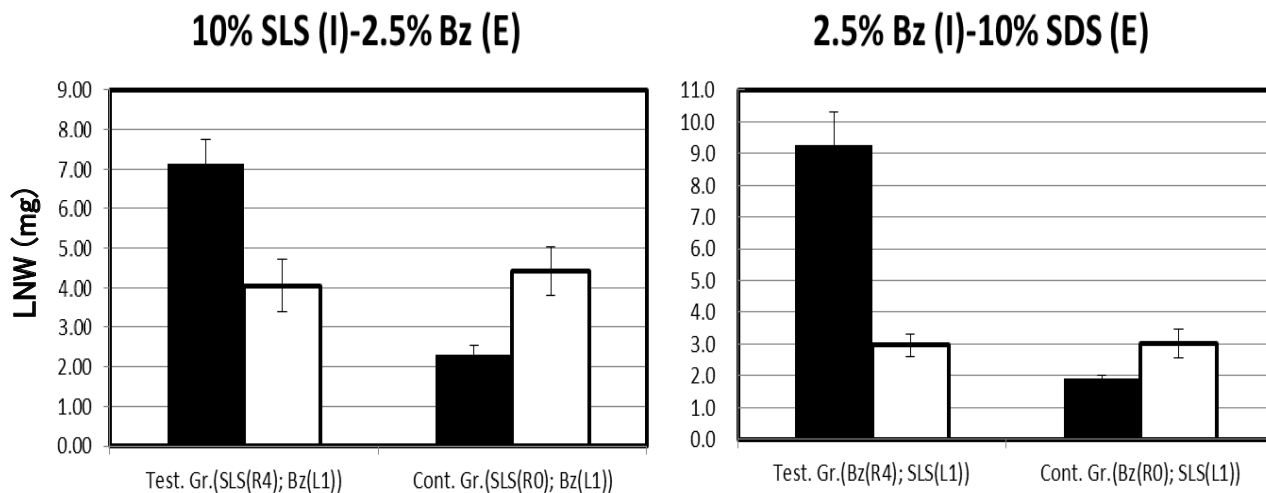


図 28 交差感作性試験を用いた惹起特異性の確認

試験群では 1 種類目の試験物質を、1、2、3、10 日目に右耳に投与し、左耳には、10 日目に 2 種類目の試験物質を投与した。コントロール群では、10 日目に 2 種類目の試験物質を左耳に投与した。12 日目に、全てのマウスのリンパ節を摘出した。黒カラムは右耳、白カラムは左耳のリンパ節重量を示し、各数値は、平均値±標準偏差(n=5)を示した。X 軸は、各投与群を示し、Y 軸はリンパ節重量を示した。

略号：10%SLS (I)-2.5%Bz (E)：10%SLS で感作し、2.5%BzCl で惹起する組み合わせを示す。

Test. Gr.(SLS(R4);Bz (L1))=試験群は、SLS を右耳に 4 回投与し、BzCl 左耳にを 1 回投与したことを示す。

Cont. Gr.(SLS (R0); Bz (L1))=コントロール群は、左耳に BzCl を 1 回投与したことを示す。

(本(図 28 は、日本職業・環境アレルギー学会雑誌,2016, 23 巻 2 号に掲載の自著論文に掲載のデータを基に作成した。)

考察

第七章で報告した不飽和脂肪酸類と同様に、LLNA法の結果が偽陽性とされる物質として、一部の界面活性剤の例が報告されている⁸⁶⁾。本章の最初に述べたが、陰イオン性界面活性剤の一種であるSLSは、LLNA及び我々の開発したLLNA:DA法において、明確に陽性反応を示す。また、陽イオン性界面活性剤の一種であるBzClは、我々の開発したLLNA:DA法では、明確に陽性反応を示すがGPMT法では陰性である。しかしながらBzClは、稀にヒトにおいて感作を起すことがあると結論されている⁸⁰⁾。

Ersoy等は、歯磨き剤に含まれているSLSに起因するアレルギー症例を報告し、プリックテストでアレルギー性を検証している。また、Lee等も歯磨き剤に含まれているSLSに起因すると考えられる症例を2例報告し、彼等はパッチテストにより、アレルギー性を検証している^{84,85)}。

また、友田等は、散瞳点眼剤に含まれるBzClに起因する眼瞼、結膜部位のアレルギー症状の複数の発症を報告している⁸²⁾。本報告においては、適切なコントロール群を置いたパッチテストが行われ、BzClのアレルギー誘発性を検証している。山田等も点眼剤に含まれるBzClが原因と考えられる過敏症状を報告している⁸³⁾。さらにAhn等は、BzClを含む吸入剤により惹起されたアナフィラキシーの症例を報告している⁸⁷⁾。本症例では、皮膚テストと、吸入試験が行われ、いずれも陽性であったとし、IgEの関与するアレルギーであると推定されている。

上記の報告は、SLS及びBzClが、口腔や、眼などの粘膜に暴露した場合に、アレルギーを起こす可能性を示唆していると考えられる。そこで、これら2つの界面活性剤が、LLNA法において誘導するリンパ節増殖反応が、単なる皮膚刺激性によるものか、アレルギー誘発の可能性を示すものか明らかにすることを目的に検討を行った。

LLNA:DAE法を用いて、SLS及びBzClの評価を行った結果。いずれも惹起反応が認められた(図24)。即ち、SLS及びBzClは、第三章で報告したIsopropanolやLactic acid等の他の刺激性物質と異なり、免疫的な反応を惹起すること、即ちアレルギー誘発性を有する事

が示唆された。

皮膚感作性等、アレルギー症状の特徴の一つとして、一度感作が成立した個体においては、初回暴露では皮膚の炎症などの刺激性を示さない濃度においても、炎症などが惹起されることが知られている。そこで、SLS と BzCl においても、刺激の出ない濃度で惹起反応が引き起こされるか否か検討した。その結果、陽性対照とした DNCB においては、刺激の出ない濃度 (0.025%) で惹起反応が認められたが、SLS (1%) と BzCl (0.25%) では惹起反応は認められなかった (図 25、26、27)。本試験において、感作誘導(induction)の程度の指標として、試験群の右耳の重量に着目した場合、10% SLS、2.5% BzCl、0.25% DNCB を暴露した場合のリンパ節重量は、それぞれ、6.5mg、8.2mg、10.6mg であり、いずれも十分な感作が行われていることが示された。上記の結果は、SLS と BzCl がアレルギー物質様の惹起反応を示すには、感作及び惹起の過程で、いずれも単回暴露で刺激性を示す濃度が必要であることを示し、通常のハプテンとなる化学物質とは違うメカニズムが関与している事が考えられた。

次に LLNA:DAE 法で SLS 及び BzCl により認められた惹起反応が、刺激性による非特異的な反応か、特異的な反応か検証するために、交差感作性試験法を用いて検討した。10% SLS と 2.5% BzCl を用いた交差感作性試験の結果を図 28 に示した。SLS で感作し、BzCl で惹起した場合、BzCl で感作し SLS で惹起したいずれの場合も惹起反応は認められなかった。即ち、LLNA:DAE 試験で認められた惹起反応に物質特異性がある事が確認された。

以上の結果は、LLNA 法や、LLNA:DA 法で報告されていた陽性結果が、単純な皮膚刺激性に起因するものではなく、SLS と BzCl のアレルギー誘発性を示す結果であると推測された。一方、低濃度では、惹起反応が認められなかったことから、DNCB とは何らかのメカニズム的な違いがあることも示唆された。

本章の始めに述べたが、これら 2 種の界面活性剤は、SLS が DPRA 法において陽性と陰性の二つの結果が報告されているのを除き、h-CLAT 法及び KeratinoSens 法においていずれも陰性と報告されている。これらの報告も、DNCB と SLS や BzCl のアレルギー誘発性に何らかのメカニズムの違いがある事を示唆している。そこで、これらがアレルギーを引き起

こすメカニズムについて文献検索を行い考察した。

最初に、これらの化合物のハプテンとしての可能性について検索した。Aleksic 等によれば、DNCB が、濃度に依存せずヒトアルブミンの特定のアミノ酸を修飾するのに対し、SLS 及び BzCl は特定のアミノ酸を修飾せず、ヒトアルブミンを変性させることが報告されていた⁸⁸⁾。即ち、DNCB と SLS 及び BzCl には、明確な違いが認められた。

次に、SLS 及び BzCl に関するアレルギーの報告が、口腔、及び眼瞼に関して認められることから、粘膜に対する影響を調べた。Ahlfors 等は、マウスの頬粘膜に、歯磨きなどに含まれる濃度である 2% SLS を暴露した結果、暴露部位の細胞の壊死と、周辺組織への T リンパ球の浸潤が認められ、更に所属リンパ節の一過性の増殖が認められたと報告している⁸⁹⁾。このことは、SLS を粘膜に暴露した場合、局所の炎症と、免疫系の活性化を引き起こすことを示唆していると考えられる。

近年になり、粘膜や表皮におけるアレルギーに重要な役割を果たす分子として、Tymic Stromal Lymphopoietin (TSLP)が注目されている。Ying 等は、喘息の気管において、TSLP が発現し、これが Th2 型のケモカインの発現を誘導していると報告している⁹⁰⁾。また有馬らは、TSLP による Th2 型免疫応答誘導の機序についてまとめている⁹¹⁾。更に、平澤等は、この TSLP に関連して、アレルギー促進化学物質という新たな概念を提唱している。これは、化学物質により誘導された TSLP の産生により、他の抗原によるアレルギー反応が増強するという概念である⁹²⁾。この TSLP との関連において、SLS の暴露により、ヒトの表皮において、TSLP の発現が誘導されることが報告されている⁹³⁾。また、Gasset 等は、0.1%~4%の高濃度の BzCl 暴露が、タンパクの変性を起こし、角膜障害をきたす事を報告している⁹⁴⁾。

これらの報告は、SLS や BzCl が口腔な眼瞼の粘膜に暴露した時に、刺激と共に免疫応答を引き起こし、同時にそれらが有するタンパク変性能を通じて、何らかのアレルギーを引き起こすという可能性を示唆する。

一方健常皮膚においては、通常今回試験したような、健常皮膚に炎症を生じる 10% SLS や 2.5% BzCl を、繰り返し皮膚に塗布することはない。例えば、臨床的に殺菌剤として用

いられる BzCl 濃度は、通常 0.005~0.03%程度である⁹⁵⁾。また、通常これらの界面活性剤は、皮膚洗浄などに用いた後速やかに洗い流される。更に本章の 2 項目に示した様に、10%SLS で感作したマウスは、1%SLS では惹起されず、また、2.5%BzCl で感作したマウスは、0.25% BzCl で惹起されなかった。この検討結果は、DNCB のような感作性物質と違い、仮に感作が成立する濃度で感作誘導されたとしても、刺激を起さないような低濃度では惹起されることが予想される。この理由に関しては、Aleksic 等の報告を参考にすれば、低濃度では惹起を誘導する十分なタンパク質の変性が生じていない可能性が考えられる⁸⁴⁾。これが、臨床において、粘膜暴露以外に、SLS や BzCl に対するアレルギーが報告されていない理由ではないかと考えた。

以上の結果から、SLS 及び BzCl は、高濃度で皮膚或いは粘膜に暴露した際に、生体にアレルギー反応を引き起こす可能性がある結論した。本研究においては、残念ながら、SLS もしくは BzCl 暴露により生じると考えられる抗原を同定するには至らず、SLS もしくは BzCl が粘膜などで引き起こしているアレルギー反応のメカニズムを完全に解明するには至らなかった。この点に関しては、今後更なる研究が必要である。一方本研究により、SLS や BzCl 等の界面活性剤の感作性評価に LLNA:DAE 法が有効であることが明らかとなったと考える。

第九章 総括及び結論

化学物質の感作性を簡便に評価し、より安全に使用するために、現在の主流である、LLNA 法及び LLNA:DA 法が潜在的に有する課題を解決するために、惹起相を含む新規 LLNA 法の開発を行った。

序論において、これまで開発された動物を用いる皮膚感作性試験の概要と課題について述べ、更にそれら課題を解決する必要性について述べた。本章で示した課題は次の 3 つであり、これらを解決することを本研究の目的とした。

1. 化学物質の皮膚刺激性に起因する非特異的リンパ節増殖による偽陽性、更に LLNA:DA 法や LLNA:BrdU-ELISA 法では境界域陽性反応が発生する可能性があり、その場合、単独の試験では判定が困難である。
2. 惹起相において感作性を判定していたモルモットを用いる GPMT 法等では可能な、化学物質間の交差感作性が判定できない。
3. 一部の化学物質群、例えば不飽和結合を含む脂肪酸、界面活性剤などの結果が GPMT 法の結果やヒトの経験と一致しない。

第二章では、序論で整理した課題を解決するために、まずマウスの左右のリンパ節の相同性、反応性などについて検討を行い、左右のリンパ節重量、25%HCA 暴露への反応性に差が無いことを確認した。次に惹起を検出する試験スケジュールの設定を行った。その結果、感作処置として、試験群のマウスの右耳に 1、2、3、10 日目に暴露を行い、惹起処置として 10 日目に左耳に暴露を行う。コントロール群のマウスは、10 日目に左耳のみに暴露を行い、いずれの群も 12 日目に左右リンパ節を摘出し、各群の左耳のリンパ節を比較することで、惹起反応を検出できることを確認した。また本試験スケジュールを用いた場合、感作濃度に依存した定量的な惹起反応が生じることを見出した。本章の検討の結果、惹起相を用いる新規 LLNA 法(LLNA:DAE 法)の投与スケジュールを決定した。

第三章では、第二章で確立した試験スケジュールを用いて、LLNA法で陽性と判定される物質 17 物質、陰性と判定される物質 7 物質、合計 24 物質の評価を行った。その結果、NiCl₂ 以外の結果は全て一致した。更に、LLNA:DA法で境界域陽性の結果を示す 7 種に関しても、全て LLNA法の結果と一致した。本章の検討の結果、LLNA:DAE法を用いて、弱い感作性物質から、極度感作性物質まで皮膚感作性が評価できることが明らかとなった。また、LLNA:DA法(OECD TG442A)で境界域陽性の結果が出た場合に、LLNA:DAE法を用いることで再分類できる可能性を明らかとした。

第四章では、LLNA:DAE法を単独の試験法として確立するための条件検討を行った。予備試験に用いる動物数、刺激の判定方法、左耳リンパ節重量を指標にした本試験濃度設定方法を検討し、予備試験を含めた試験スキームを設定した。さらに、設定した試験スキームを 9 種類の化学物質を用いて検証した。本章の検討の結果、LLNA:DAE法を単独の試験法として確立した。

第五章では、LLNA:DAE法の結果と皮膚感作性強度の相関について検討した。LLNA法では、化学物質の感作性の評価を行うのに、少なくとも 3 濃度の暴露を行い、試験群のリンパ節へのトリチウムチミジンの取り込みが、コントロール群の 3 倍を超える濃度(EC3)を算出し、その値によって感作性の強度を予測する。一方 LLNA:DAE法では、1 濃度で試験を行う。本章においては、LLNA:DAE法における、試験群とコントロール群の左耳のリンパ節重量の差を、化学物質の感作性により引き起こされた惹起量と規定し、暴露濃度との相関を以下に示した 2 つの指標(DILL value と EC1mg%)で算出した。

1.
$$\text{DILL value} = \frac{(\text{試験群の左耳のリンパ節重量} - \text{コントロール群の左耳のリンパ節重量})}{\text{試験濃度}(\%)}$$

これは試験群とコントロール群の左耳のリンパ節重量の差を、刺激によるリンパ節重

量を含まない感作による増加量と想定し、化学物質 1%当たりのリンパ節増加量。

2. $EC1mg\% = \frac{\text{試験濃度}}{(\text{試験群の左耳のリンパ節重量} - \text{コントロール群の左耳のリンパ節重量})}$

これは試験群とコントロール群の左耳のリンパ節重量の差を、刺激によるリンパ節重量を含まない、感作による惹起量と想定し、惹起により 1mg のリンパ節重量を引き起こすのに必要な化学物質の濃度である。

本章の検討の結果、これら 2 つの指標はいずれも、LLNA 法で皮膚感作性の強度分類と関係がある事が明らかとなり、LLNA:DAE 法の結果が、皮膚感作性強度の比較に活用できることが示された。

第二章から第五章までの検討の結果、LLNA:DAE 法は、惹起相を含む新規の LLNA 法として、従来の LLNA 法並びに LLNA:DA 法に加えて活用できる事が明らかとなった。

第六章では、LLNA:DAE 法を用いた交差感作性評価について検討した。序論で述べたように、従来の LLNA 法は、感作性の判定を感作誘導期のリンパ節の増殖を指標とするため、原理的に交差感作性は評価できない。そこで、交差感作性のあることが知られている 2 つの化学物質の組み合わせと、交差感作性ありとする報告が無い 2 つの化学物質の組み合わせを用いて、LLNA:DAE 法を用いて交差感作性が検出できるか否か検証した。その結果、LLNA:DAE 法が、交差感作性の検出に有効であることが明らかとなった。

第七章では、LLNA 法の結果が、GPMT 法の結果及びヒトの知見と一致しない場合があることが知られている脂肪酸類の皮膚感作性を明らかにするために、8 種類の脂肪酸類について LLNA:DAE 法と *in-vitro* 試験法の DPRA 法を用いて評価を行った。その結果、評価した 8 種類のうち 5 種類は皮膚感作性があることが明らかとなった。また、LLNA:DAE 法で、弱い感作性を示した 5 種類の物質の内、Linolenic acid と Maleic acid は LLNA 法

では中程度の感作性を示すとされていた。また、同じく LLNA 法で中程度の感作性を示すとされていた Squalene は、LLNA:DAE 法では陰性であった⁵⁾。これらの結果から、これら脂肪酸類の化合物の感作性評価には、LLNA 法よりも、LLNA:DAE 法が適している可能性がある事を明らかとした。

第八章では、LLNA 法の結果が、GPMT 法の結果及びヒトの知見と一致せず、LLNA 法の結果が偽陽性であると考えられている界面活性剤のアレルギー誘発性を明らかにするために、LLNA:DAE 法を用いた評価を行った。その結果、試験した SLS 及び BzCl は、LLNA:DAE 法で陽性の結果を示した。また、交差感作性試験を応用し、それぞれのリンパ節増殖反応の特異性を検証した結果、それぞれ特異的なリンパ節増殖反応を誘導していることが明らかとなり、LLNA:DAE 法がこれら界面活性剤の評価に有効であることが明らかとなった。また、本研究から得られた結果と、論文等の既知情報の結果から、SLS 及び BzCl は、通常の感作性物質とは違うメカニズムによってアレルギーを引き起こすことが示唆された。

本研究を通じて以下に示す結果と結論が得られた。

惹起相を含む新規皮膚感作性試験法 LLNA:DAE 法を確立し、研究開始に当たり設定した 3 つの課題を解決し、以下に示す成果を得た。

1. LLNA 法、LLNA:DA 法及び LLNA:BrdU-ELISA 法において、偽陽性の原因となる、化学物質の皮膚刺激性に起因するリンパ節の非特異的増殖と、感作性に基づく免疫が関与した特異的リンパ節増殖を、LLNA:DAE 法を用いることで明確に識別出来る事を 33 種類の化学物質を用いて証明した。これにより、LLNA:DAE 法を用いることで、従来の LLNA 法に比べて、より正確な感作性評価が出来る可能性が明らかとなった。
2. LLNA 法では不可能であった化学物質間の交差感作性が判定出来るようになった。化

学物質の交差感作性は、特に外用医薬品などにおいては、薬害防止や、薬疹の原因究明のために必要とされる試験であり、これがマウスで可能となったことは、ヒトの健康を守るために非常に有効であると考えられる。

3. 一部の化学物質群、例えば不飽和結合を含む脂肪酸、界面活性剤など、LLNA 法の結果が、GPMT 法の結果やヒトの知見と一致しない化合物について、それらの化合物の皮膚感作性、あるいはアレルギー誘発性を評価出来るようになった。現在皮膚感作性試験において、*in-vitro* 法の開発と実用化が求められている。この点に関し、LLNA 法では正確に評価できない可能性のある化合物群が、LLNA:DAE 法を用いることで正確な評価が行えることが示された。これは、今後の *in-vitro* 法の開発においても非常に有効であると考えられる。
4. 当初設定した 3 つに加え、LLNA:DAE 法を用いて、感作性の有無だけでなく強度も判定できることが示された。現在、動物を用いる皮膚感作性試験法は、LLNA 法や、LLNA:DA 法が主流である。LLNA:DAE 法は、試験に用いる動物数が、これらの半分以下であり、動物愛護にも適した手法であると考えられる。

以上の結果は、今回研究した LLNA:DAE 法が新規皮膚感作性試験法として、ヒトが安全に化学物質を取り扱う上で非常に有効な試験法となりうることを示している。

謝辞

本研究をまとめる機会をくださり、またまとめるにあたり、終始ご指導と御鞭撻を賜りました横浜国立大学教授板垣宏先生に謹んで感謝いたします。また、本研究を行うに当たり、苦楽を共にして下さいました株式会社薬物安全性試験センター篠田伸介研究員、萩原沙織研究員に深く感謝いたします。また、本研究において、統計処理部分で貴重な御助言とご指導いただきました、神戸大学大学院医学研究科大森崇特命教授に深く感謝いたします。

研究を遂行する上で、暖かい御理解と御援助を頂きました株式会社ダイセル取締役常務執行役員研究開発本部本部長西村久雄氏、元総合研究所所長岩井保範氏、研究開発本部コーポレート研究センターの道津邦彦博士に心よりお礼申し上げます。

本研究を行うに当たり、御協力を頂きました株式会社ダイセル研究開発本部コーポレート研究センター評価開発グループの宮崎洋研究員をはじめとする評価開発グループ研究員の皆様に心よりお礼申し上げます。また、本研究に関し、活発な議論をしていただいた、横浜国立大学板垣研究室の学生の皆様に心よりお礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行と論文の作成を行うに当たって、終始暖かく支えてくれた妻香織、長女瑞生、次女愛未に深く感謝する。

実験の詳細

第二章の実験の詳細

1. 動物

試験に用いる CBA/Jcrj マウス(7週~11週)は、日本チャールスリバーから購入し、5日以上馴化し健康なマウスを使用した。飼育環境は、温度 $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は $55\% \pm 15\%$ 、また、1時間当たり 12 回に相当する換気を行った。また、本論文に記載の全ての動物実験は、薬物安全性試験センターの動物実験倫理規定に従って行われた。

2. 化学物質

本章の検討で用いた化学物質については試験条件と共に表 1 に示した。また、溶媒として用いたアセトンは和光純薬工業(株)より購入し、オリーブオイルは吉田製薬(株)から購入した。ATP 測定試薬は、(株)キッコーマンより購入した。

3. リンパ節重量の測定

リンパ節重量は、Sartorius CP124S を用いて、0.1mg まで測定した。

4. Adenosine triphosphate (ATP) の測定

ATP の測定は、キッコーマン社製 ATP 測定キット (ルシフェール 250 プラス) とルミノメーター (キッコーマン社製 C-100) を用いて LLNA:DA 法で規定された ATP 測定法で行った。

マウスから摘出したリンパ節を 2 枚のスライドガラスにはさんで軽くつぶし、次に各 1mL の Invitrogen 社製のリン酸緩衝液 (pH7.4) に懸濁した。このうち、20 μL を 1.98mL のリン酸緩衝液 (pH7.4) で希釈し試験液とした。

試験液の 100 μL を、ATP 抽出液 100 μL に添加し、更に発光試薬 100 μL を添加し、素早くボルテックスミキサーで数秒攪拌した後に、ルミテスター C-100 を用いて発光量

(relative luciferase unit: RLU) を記録した。

5. 左右のリンパ節の相同性の確認

11週のマウス(10匹)より、左右のリンパ節を個別に摘出し重量及びATP量を測定した。相同性の検証は、左右のリンパ節重量を求め、左右それぞれのリンパ節重量及びATP量に関し *Student's* の T 検定を行い、統計的有意差がない場合に同等であると判断した。本研究において、右側リンパ節、左側リンパ節は図7に規定した。

6. 左右のリンパ節の刺激に対する反応性の確認

左右のリンパ節の刺激に対する反応性の確認は、1群5匹、2群の計10匹のマウスを用いて行った。

第1群のマウスは右側の耳介に、25 μ Lの25%Hexyl cinnamic aldehyde (HCA)/アセトン:オリーブオイル(4:1)(AOO)をマイクロピペットを用いて塗布した。第2群のマウスには、左側の耳介に25 μ Lの25%HCA/AOOをマイクロピペットを用いて塗布した。塗布後48時間後に左右のリンパ節を個別に摘出し重量及びATP量を測定した。

化学物質に対する反応性の検証は、左右のリンパ節重量を求め、HCA塗布群のリンパ節重量及びATP量に関し *Student's* の T 検定を行い、統計的有意差がない場合に刺激に対する反応性は同等であると判断した。

7. 左右のリンパ節の独立性の確認

左右のリンパ節の独立性を検証するために、リンパ節増殖活性を有することが明らかとなっている化学物質を、右側の耳介に1、2、3、10日目に塗布し、12日目に左右リンパ節を摘出しリンパ節重量を測定した。左右のリンパ節の独立性の検証は、ナイーブマウスと比較し、右側のリンパ節増殖が認められ、かつ左側のリンパ節の増殖が認められない場合に、本研究において左右のリンパ節において独立性があると判断した。

本検討において、以下に示す化学物質を用いた。

- (1) 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB): 皮膚刺激性を有する極度感作性物質
- (2) HCA: 皮膚刺激性を有する弱感作性物質
- (3) SLS: 皮膚刺激性物質
- (4) Xylene: リンパ節増殖活性を有する有機溶媒

これら 4 種の化学物質は、LLNA 法においていずれも有意なリンパ節増殖を誘導することが知られている。また DNFB と HCA は皮膚感作性物質であり、SLS と Xylene は、LLNA 法において偽陽性とされる物質である。

8. 惹起相を導入した新規 LLNA 法の試験スケジュールの検討

惹起相を導入した新規 LLNA 法のスケジュールを、25%HCA/AOO を用いて検討した。この検討のために、以下に示す 4 群を設定した。

第 1 群 (First group) は、25%HCA/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量と ATP 量を測定した。

この群は、25%HCA の 3 回の暴露、即ち感作処置により引き起こされるリンパ節の増殖の程度を測定するために行った。

第 2 群 (Second group) は、25%HCA/AOO 溶液 25 μ L を、10 日目に左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量と ATP 量を測定した。

この群は、25% HCA の左側への単回の暴露により引き起こされるリンパ節の増殖の程度を測定するために行った。

第 3 群 (Third group) は、25% HCA/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 日目に塗布し、左側の耳介には 10 日目のみに塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量と ATP を測定した。

第 4 群 (Fourth group) は、25% HCA/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 日目に塗布し、10 日目に両側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量と ATP を測定した。

9. 惹起反応の濃度依存性の確認

感作段階の試験濃度と、惹起反応の濃度依存性を調べる目的で、4群のマウスを用いて検討を行った。0.06%、0.13%、0.25% 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB)/A00 を3群それぞれのマウスの右側の耳介に1、2、3日目に塗布し、10日目に0.25% DNCBを両側の耳介に塗布し、12日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。コントロール群は、0.25% DNCB/A00 を10日目に左側の耳介に塗布し、12日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

10. 統計処理

本章において、惹起反応の検出は、比較する2群間の統計的有意差に基づいて行った。統計的有意差の検定は、Excel (Microsoft、(USA))に搭載された統計ソフトを用いて *student's* の *t*-test を行った。

第三章の実験の詳細

1. 動物及びリンパ節重量の測定

動物実験及びリンパ節重量の測定は、第二章 1 及び 3 に記載した方法にて行った。

2. 化学物質

本章の検討で用いた 24 種類の化学物質については試験条件と共に表 2 に示した。

3. LLNA:DAE 試験

各化学物質について、2 群の動物を使用した。

試験群(第 1 群)は、試験物質溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 日目に塗布し、10 日目に左右両側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

コントロール群(第 2 群)は、試験物質溶液 25 μ L を、10 日目に左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

4. 皮膚感作性の判定

皮膚感作性の陽性判定は、コントロール群と試験群左耳耳介リンパ節重量の平均の差が含まれる 95%信頼区間を t 分布に基づき算出し、その下限が 0 より大きい場合に陽性と判定した。

従来は、各群のデータのばらつきの範囲を、 t 分布により検定していた。今回は両群の平均の差の含まれる範囲で検定した。

本検定法の式を以下に示した。

$$V = (\sum_{i=0}^{n_x} (x_i - \bar{x})^2 + \sum_{i=0}^{n_y} (y_i - \bar{y})^2) / (n_x + n_y - 2)$$

$$\text{下限 } C = |\bar{x} - \bar{y}| - t(n_x + n_y - 2, 0.025) * \sqrt{V * (1/n_x + 1/n_y)}$$

X: 試験群の惹起側リンパ節重量

Y:コントロール群の惹起側リンパ節重量

n_x :試験群の動物数

n_y :コントロール群の動物数

$t(n_x + n_y - 2, 0.025)$:自由度 $n_x + n_y - 2$ 、有意水準 0.025 の t 分布

上記の試験群の左耳リンパ節重量の平均値の 95%信頼限界の下限值は、以下の計算式によって示される。

$$S_x^2 = \sum_{i=0}^{n_x} (x_i - \bar{x})^2, S_y^2 = \sum_{i=0}^{n_y} (y_i - \bar{y})^2$$

$$V = \frac{S_x^2 + S_y^2}{n_x + n_y - 2}$$

$$\frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{V * (\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y})}} = t(n_x + n_y - 2, 0.025)$$

$$\frac{(\bar{x} - \bar{y}) - (\mu_x - \mu_y)}{\sqrt{V * (\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y})}} = \pm t(n_x + n_y - 2, 0.025)$$

$$\mu_x - \mu_y = (\bar{x} - \bar{y}) \pm t(n_x + n_y - 2, 0.025) * \sqrt{V * (\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y})}$$

$$C = |\bar{x} - \bar{y}| - t(n_x + n_y - 2, 0.025) * \sqrt{V * (\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y})}$$

第四章の実験の詳細

1. 動物及びリンパ節重量の測定

動物及びリンパ節重量の測定は、第二章 1 及び 3 に記載した方法にて行った。

2. 試験物質

本章で用いた化学物質の種類、購入元、純度、試験濃度及び使用溶媒を表 4 にまとめた。

3. 予備試験に用いる動物数の検討

予備試験に用いる動物数を決定するために、各群 3 匹計 12 匹の動物を用いて、HCA を用いた検討を行った。

第 1 群は、100 % HCA/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 日目に塗布し、10 日目に両側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 2 群は、50% HCA/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 日目に塗布し、10 日目に両側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 3 群は、25% HCA/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 日目に塗布し、10 日目に両側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 4 群は、12.5% HCA/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 日目に塗布し、10 日目に両側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

また、試験期間中は、動物の全身状態を観察すると共に、試験開始前と試験終了時に体重を測定し全身毒性の指標とした。皮膚刺激性の指標として、暴露 1 日目から試験終了の

12日目まで紅斑の測定を行い、また、試験1、2、3、10日目及び12日目に耳介厚の測定を行った。

4. 刺激性の測定及び判定

皮膚刺激性の判定は、次のように行った。即ち紅斑スコアが3以上または耳介厚みが25%以上増加した場合には過度の刺激反応とみなした。

紅斑

紅斑のスコアは以下の基準で行った。

スコア0: 紅斑なし

スコア1: ごく軽度の紅斑(かろうじて識別できる)

スコア2: はっきりした紅斑

スコア3: 中等度から重度の紅斑

スコア4: 重度の紅斑(ビート様の色)から紅斑の採点ができないほどの痂皮形成

耳介厚の腫脹測定

耳介厚の測定は、デジタル式の機器(PEACOCK の DIGITAL THICKNESS GAUGE (G2-257M))を用いて実施した。耳介の同一部位(端部)を1回の測定で複数回(3回以上)行い平均値を測定した。

5. Isoeugenol(IEU)及び DNCB を用いた予備試験に関するモデル検討

3匹のマウスに HCA を投与して行った検討結果により、予備試験における各計測項目(耳介厚、紅斑、リンパ節重量)のマウス間のばらつきが大きくないことが示唆された。そこで、各濃度1匹のマウスを用いて、IEU 及び DNCB を用いた予備試験のモデル検討を行った。

IEU に関しては、各濃度1匹のマウスを用いて、50%、25%、12.5%、5%の4濃度の検討を行った。DNCB に関しては、0.5%、0.25%、0.13%、0.06%の4濃度の検討を行っ

た。

6. 惹起に必要な最低濃度の検討

HCA は 50%、IUE は 25%、DNCB は 0.25%を最高濃度とした 4 濃度の LLNA:DAE 試験を行った。各試験サンプルの投与最高濃度は、全身毒性を示さず、かつ、過度な刺激を生じない最高濃度を選択した。この検討には、各物質 6 群、計 18 群、各群 5 匹のマウスを用いた。HCA に関する検討は、以下に示す第 1 群から 6 群を用いて試験濃度による惹起反応の検出の可否及び濃度依存性を調べた。

第 1 群は、12.5% HCA/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 日目に塗布し、10 日目に両側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 2 群は、12.5% HCA/AOO 溶液 25 μ L を、10 日目に左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 3 群は、25% HCA/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 日目に塗布し、10 日目に両側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 4 群は、25% HCA/AOO 溶液 25 μ L を、10 日目に左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 5 群は、50% HCA/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 日目に塗布し、10 日目に両側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 6 群は、50% HCA/AOO 溶液 25 μ L を、10 日目に左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 7 群は、5% IEU/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 日目に塗布し、10 日目に両側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定

した。

第 8 群は、5% IEU/AOO 溶液 25 μ L を、10 日目に左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 9 群は、12.5% IEU/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 日目に塗布し、10 日目に両側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 10 群は、12.5% IEU/AOO 溶液 25 μ L を、10 日目に左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 11 群は、25% IEU/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 日目に塗布し、10 日目に両側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 12 群は、25% IEU/AOO 溶液 25 μ L を、10 日目に左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 13 群は、0.06% DNCB/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 日目に塗布し、10 日目に両側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 14 群は、0.06% DNCB/AOO 溶液 25 μ L を、10 日目に左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 15 群は、0.13% DNCB/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 日目に塗布し、10 日目に両側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 16 群は、0.13% DNCB/AOO 溶液 25 μ L を、10 日目に左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 17 群は、0.25% DNCB/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 日目に塗布し、10 日目に両側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を

測定した。

第 18 群は、0.25% DNCB/AOO 溶液 25 μ L を、10 日目に左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

7. 9 種類の化合物を用いた試験方法の検証

予備試験

強度感作性物質として、Glutaraldehyde(6.25%を最高濃度)及び Propyl gallate(25%を最高濃度)、中程度感作性物質として、Cinnamic aldehyde(50%を最高濃度)、Nickel(II) hexahydrate(25%を最高濃度)及び Resorcinol(50%を最高濃度)、弱い感作性物質として Abietic acid(50%を最高濃度)及び Hydroxycitronell(100%を最高濃度)、非感作性物質として Glycerol(100%を最高濃度)及び Sulfanilamide(50%を最高濃度)を用いた。

各試験物質に付き、各濃度マウス 1 匹、4 濃度の予備試験を以下に示す条件で行った。それぞれの最高濃度は、強い刺激性もしくは感作性が明らかな Glutaraldehyde、Propyl gallate に関しては、動物愛護の観点から既知の報告を参考にしたが、それ以外は、新規の化学物質のモデルとして、液体は 100%、固体に関しては溶解できる最高濃度を用いた。

それぞれ、表 6 に示した溶媒に溶解した 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 日目に塗布し、10 日目に両側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

耳介の紅斑の測定は、暴露 1 日目から 12 日目まで連続で行い、耳介厚の測定は、暴露 1、3、5、10、12 日目の暴露前に実施した。

本試験

本試験は、それぞれ Glutaraldehyde は 1.56%、Propyl gallate は 6.25%、Cinnamic aldehyde は 12.5%、Nickel(II) hexahydrate、Resorcinol 及び Abietic acid は 25%、Hydroxycitronell 及び Sulfanilamide は 50%、Glycerol は 100%の濃度で試験した。

8. 判定

感作性の判定は、第三章に示した方法に従って行った。

第五章の実験の詳細

1. データ

本章で解析に用いたデータは、第三章及び第四章で検討した計 33 物質の左側リンパ節重量を用いた。皮膚感作性強度と EC3 の値は、Nukada *et al.* (2013)から引用した。

2. データ解析

EC1mg%と EC3 値の相関の解析は、Excel に搭載されたグラフソフトを用いて解析を行った。

第六章の実験の詳細

1. 動物及びリンパ節重量の測定

動物及びリンパ節重量の測定は、第二章 1 及び 3 に記載した方法にて行った。

2. 試験物質

交差感作性の検証には、DNCB と DNFB、Benzoquinone(BQ)と Hydroquinone(HQ)、HCA と DNFB、SLS と Xylene の 4 種類の組み合わせを選択した。

それぞれの暴露濃度は、これまでの検討結果から、十分なリンパ節増殖活性を有する濃度を選択し、DNCB と DNFB に関しては 0.25%、BQ と HQ に関しては 1%、HCA に関しては 25%、SLS に関しては 10%、Xylene に関しては 100%を選択した。

3. 感作性物質を用いた交差感作性の検出方法の検証

本検討には、1 組の組み合わせに付き 4 群の動物/計 16 群を用いた。以下に、DNCB と DNFB を例に記述する。

第 1 群 0.25% DNCB /AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3、10 日目に塗布し、10 日目に 0.25% DNFB /AOO 溶液 25 μ L 左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 2 群 0.25% DNFB /AOO 溶液 25 μ L を、左側の耳介に 10 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 3 群 0.25% DNFB /AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3、10 日目に塗布し、10 日目に 0.25% DNCB /AOO 溶液 25 μ L 左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 4 群 0.25% DNCB /AOO 溶液 25 μ L を、左側の耳介に 10 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 5 群 1% BQ/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3、10 日目に塗布し、10 日目

に 1% HQ/AOO 溶液 25 μ L 左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 6 群 1% HQ/AOO 溶液 25 μ L を、左側の耳介に 10 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 7 群 1% HQ /AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3、10 日目に塗布し、10 日目に 1% BQ/AOO 溶液 25 μ L 左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 8 群 1% BQ /AOO 溶液 25 μ L を、左側の耳介に 10 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 9 群 0.25% DNFB/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3、10 日目に塗布し、10 日目に 25% HCA/AOO 溶液 25 μ L 左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 10 群 25% HCA/AOO 溶液 25 μ L を、左側の耳介に 10 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 11 群 25% HCA/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3、10 日目に塗布し、10 日目に 0.25% DNFB/AOO 溶液 25 μ L 左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 12 群 0.25% DNFB /AOO 溶液 25 μ L を、左側の耳介に 10 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 13 群 10% SLS /DMF 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3、10 日目に塗布し、10 日目に 100% Xylene 溶液 25 μ L 左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 14 群 100% Xylene 溶液 25 μ L を、左側の耳介に 10 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 15 群 100% Xylene 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3、10 日目に塗布し、10 日

目に 10% SLS/DMF 溶液 25 μ L 左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 16 群 10% SLS/DMF 溶液 25 μ L を、左側の耳介に 10 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

4. 交差感作性の判定

交差感作性の判定は、試験群と、コントロール群の左耳のリンパ節重量を基に、第三章記載した方法に従って行った。

第七章の実験の詳細

1. 動物及びリンパ節重量の測定

動物及びリンパ節重量の測定は、第二章 1 及び 3 に記載した方法にて行った。

2. 試験物質

本章で用いた化学物質を LLNA:DAE 法で用いた溶媒と共に、表 12 にまとめた。

3. LLNA:DAE 試験

予備試験

第四章で確立した試験方法に従い行った。予備試験に供した濃度は、Squalene は最高濃度を 100% として、その他は最高濃度を 50% として、公比 2 でそれぞれ 4 段階の濃度を用いた。

本試験

本試験は Oleic acid は 10%、Linoleic acid、Linolenic acid 及び Undecylenic acid は 25% の濃度で試験した。Fumaric acid、Maleic acid、Succinic acid 及び Squalene は、50% 濃度で試験した。試験には、それぞれ試験群とコントロール群の二群の動物を用いた。

4. 判定

感作性の判定は、第三章に示した方法で行った。

5. DPRA 法による皮膚感作性評価

DPRA 法は、OECD TG442C に従い以下の手順で行った。以下に示した 2 種類のペプチド(K-pep、C-pep)を、それぞれ、0.667mM になるように、100mM の酢酸アンモニウムバッファー(pH10.2)もしくは、リン酸バッファー(pH7.5)に溶解した。試験物質は、100mM

濃度になるように、Acetonitrile, Isopropanol, もしくは DMSO/ACN (9:1)溶液に溶解した。

DPRA 法に用いた 2 種類のペプチド

Ac-RFAACAA-COOH

Cystein ペプチド

Ac-RFAAKAA-COOH

Lysine ペプチド

略号 : Ac: Acetylation, R: Arginine, F: Phenylalanine, A: Alanine, C: Cysteine, K:Lysine

C-pep 反応液は、C-pep 溶液750 μ L、ACN 200 μ L、50 μ Lの試験物質を混合して調整した。

K-pep 反応液は、K-pep溶液750 μ Lに、250 μ Lの試験物質を混合して調整した。それぞれの反応液は、n=3 で調整し、25 $^{\circ}$ Cの暗所にて24時間反応した。

反応終了後、それぞれの反応液をHPLCを用いて分析し、反応率を算出した。HPLCシステム及び使用カラム、分析条件を以下に示す。

HPLCシステム : Waters Alliance 2690 system (Waters Corporation, Milford, MA, USA)

カラム : Zorbax SB-C18 column (3.5 μ m, 100 \times 2.1 mm; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

検出波長及び検出器 : UV detection at 220 nm, Waters 2487 UV/Vis detector.

分析条件 : 流速 0.35mL/min

グラジエント A 90% \Rightarrow A 75% in 10min

A (0.1% TFA in water): B (0.085% TFA in ACN)

反応率 : 溶媒対照のペプチドを100%とした場合に対する、試験物質群のペプチドの減少率を反応率とした。

感作性の判定は、OECD TG442Cに記載された基準に従い、C-pep 及びK-pep の反応率の平均が6.38%以上の時に感作性陽性と判定した。また反応性は、OECD TG442Cに記載され

た基準に従い判定した。

6. 交差感作性試験

第1群 50% Maleic acid / DMSO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3、10 日目に塗布し、10 日目に 25% Linolenic acid / AOO 溶液 25 μ L 左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第2群 25% Linolenic acid / AOO 溶液 25 μ L を、左側の耳介に 10 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第3群 Linolenic acid / AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3、10 日目に塗布し、10 日目に 50% Maleic acid / DMSO 溶液 25 μ L 左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第4群 50% Maleic acid / DMSO 溶液 25 μ L を、左側の耳介に 10 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

同様に、第5群から8群までの動物を用いて、10% Oleic acid/ AOO と 25% Undecylenic acid/ AOO の組み合わせについて検討した。

第八章の実験の詳細

1. 動物及びリンパ節重量の測定

動物及びリンパ節重量の測定は、第二章 1 及び 3 に記載した方法にて行った。

2. 試験物質

試験物質としては、SLS と BzCl を選択し以下の濃度で試験を実施した。

3. LLNA:DAE 法による皮膚感作性評価

SLS と BzCl の皮膚感作性を検証する目的で、10% SLS 及び 2.5% BzCl を用いて LLNA:DAE 試験を行った。これらの濃度は、LLNA 法及び LLNA:DA 法で陽性と判定されるリンパ節増殖を引き起こすことが報告されている濃度である⁽²⁴⁾。本検討に第 1 群から 4 群のマウスを用いた。

第 1 群 10% SLS/DMF 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3、10 日目に塗布し、10 日目に 10 % SLS/DMF 溶液 25 μ L 左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 2 群 10% SLS/DMF 溶液 25 μ L を、左側の耳介に 10 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 3 群 2.5% BzCl /AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3、10 日目に塗布し、10 日目に 2.5% BzCl /AOO 溶液 25 μ L 左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 4 群 2.5% BzCl /AOO 溶液 25 μ L を、左側の耳介に 10 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

4. 惹起の濃度依存性の検討

感作濃度は、LLNA:DAE 法において、それぞれ試験群の右耳に十分なリンパ節増殖

を引き起こす、即ち十分な感作を引き起こすと考えられる濃度であり、惹起はその 1/10 の濃度とした。また、それぞれの 1/10 の濃度での LLNA:DAE 試験を行い惹起誘導能の有無と刺激性について確認した。

試験は、11 群の動物を用いて行った。SLS は、10%で感作し 1%で惹起、感作、惹起とも 1%で行う場合を実施した。BzCl は、2.5%で感作し 0.25%惹起、感作、惹起とも 0.25%で行う場合を実施した。DNCB は、0.25%で感作し 0.025%で惹起、感作、惹起とも 0.025%で行う場合を実施した。

第 1 群 10% SLS/DMF 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3、10 日目に塗布し、10 日目に 1% SLS/DMF 溶液 25 μ L 左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 2 群 1% SLS/DMF 溶液 25 μ L を、左側の耳介に 10 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 3 群 1% SLS/DMF 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 に塗布し、10 日目に 1% SLS/DMF 溶液 25 μ L を両側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 4 群 1% SLS/DMF 溶液 25 μ L を、左側の耳介に 10 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 5 群 2.5% BzCl/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3、10 日目に塗布し、10 日目に 0.25% BzCl/AOO 溶液 25 μ L 左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 6 群 0.25% BzCl/AOO 溶液 25 μ L を、左側の耳介に 10 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 7 群 0.25% BzCl/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3 に塗布し、10 日目に 0.25% BzCl/AOO 溶液 25 μ L を両側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 8 群 0.25% BzCl/AOO 溶液 25 μ L を、左側の耳介に 10 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

この検討では、第 1 群、2 群及び 5 群 6 群を用いて、高濃度で感作された個体で、その 1/10 濃度で惹起が生じるか検討し、第 3 群と 4 群及び 7 群と 8 群で、低濃度で試験した場合の反応を確認した。

感作性物質は、感作が成立した個体において、刺激の出ない低濃度でも惹起反応を引き起こす。そこで比較対象として、DNCB を用いて以下に示す 3 群の試験を行った。

第 9 群 0.25% DNCB /AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3、10 日目に塗布し、10 日目に 0.025% DNCB /AOO 溶液 25 μ L 左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 10 群 0.025% DNCB /AOO 溶液 25 μ L を、左側の耳介に 10 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 11 群 0.025% DNCB /AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1,2,3 日目に塗布し、10 日目に 0.025% DNCB /AOO 溶液 25 μ L を両側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

5. リンパ節増殖活性の物質特性の検討

以下に示す 4 群のマウスを用いた。

第 1 群 10% SLS/DMF 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3、10 日目に塗布し、10 日目に 2.5% BzCl/AOO 溶液 25 μ L 左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 2 群 2.5% BzCl/AOO 溶液 25 μ L を、左側の耳介に 10 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 3 群 2.5% BzCl/AOO 溶液 25 μ L を、右側の耳介に 1、2、3、10 日目に塗布し、10

日目に 10% SLS/DMF 溶液 25 μ L 左側の耳介に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

第 4 群 10% SLS/DMF 溶液 25 μ L を、左側の耳介に 10 日目に塗布し、12 日目にリンパ節を摘出し左右のリンパ節重量を測定した。

6. 判定

感作性及び交差感作性の判定は、第三章に示した方法で行った。

参照文献

- (1) European Agency for Safety and Health at work (2003): Factsheets 40, skin sensitizer.
- (2) Anthony, T. J. G., Marlène I., Erik, Z., Chee, L. G. and Margnus, B. (2005): Contact allergy to (meth) acrylates in the dental series in southern Sweden:simultaneous positive patch test reaction pattern and possible screening allergens. *Contact Dermatitis*, **55**, 219-226.
- (3) Katsumura, Y., Sugiyama, M. and Hori, Y. (1996): Research article Contact allergenicity of metals in guinea pigs, *Environmental Dermatology*, **3**, 8-15.
- (4) United Nations (UN) (2013): Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013.
- (5) <https://www.sanei.or.jp/images/contents/309/kyoyounoudo.pdf>
- (6) ECETOC (2003): Contact sensitisation, classification according to potency: Technical Report No. 87. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussel, Belgium.
- (7) Kimber, I., Mitchell, J. A. and Griffin, A. C. (1986) Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential, *Food and Chemical Toxicology*, **24**, 585-586.
- (8) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberich, G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Scholes, E. W., Ladics, G. S., Loveless, S. E., House, R. V., and Guy, A. (1995) An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures, *Toxicology*, **103**, 63-73
- (9) 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, *Food and Chemical Toxicology*, **30**, 65-69.
- (10) Basketter, D. A., Gerberich, G. F., Kimber, I. and Loveless, S. E. (1996) The local lymph node assay: a viable alternative to currently accepted skin sensitization test, *Food and Chemical Toxicology*, **34**, 985-997.
- (11) Basketter, D. A., Evans, P., Fielder, R. J., Gerberich, G. F., Dearman, R. J. and Kimber, I. (2002) Local lymph node assay – validation, conduct and use in practice, *Food and Chemical Toxicology*, **40**(5), 593-598.
- (12) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G. and Stokes, W.S. (2001): ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Regulatory and Toxicology Pharmacology*, **34**, 258-273.
- (13) Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Regulatory and Toxicology Pharmacology*, **34**, 274-286.
- (14) OECD (2002) Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, in *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, No. 429, OECD.
- (15) Gad, S. C., Dunn, B. J., Dobbs, D. W., Reilly, C. and Walsh, D. (1986): Development and Validation of an Alternative Dermal Sensitization Test: The Mouse Ear Swelling Test (MEST). *Toxicology and Applied Pharmacology*, **84**, 93-114.
- (16) Gad, S. C. (1994): The mouse ear swelling test (MEST) in the 1990s. *Toxicology*, **93**, 33-46.
- (17) Dunn, J. B., George, R. M., Siglin, C.J. and Blaszcak, L. D. (1990): Variability of a Mouse Ear Swelling Test (MEST) in predicting weak and moderate contact

- sensitization. *Fundamental and Applied Toxicology*, **15**, 242-248
- (18)Magunusson B. and Kligman A. M. (1969): The identification of contact allergens by animal assay, The guinea pig maximization test. *Journal of Investigative Dermatology*, **52**, 268-276.
- (19)Buehler, E. V. (1965): Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Archives of Dermatology*, **91**, 171-177.
- (20)OECD (1992): *OECD guideline for the Testing of Chemicals*, Test No.406.: Skin sensitization, adopted July 1992. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.
- (21)OECD (2010b): *OECD guideline for the Testing of Chemicals*, Test No.429.: Skin sensitization: Local Lymph Node Assay, adopted July 2010. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.
- (22)Yamashita, K., Idehara, K., Fukuda, N., Yamagishi, G. and Kawada, N. (2005).: Development of a modified local lymph node assay using ATP measurement as an endpoint. *Alternative to Animal Testing and EXperimentation*, **11**, 136-144.
- (23)Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008): Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *Journal of Pharmacological. Toxicological Methods*, **58**, 1-10.
- (24)Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A.(2008): Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *Journal of Pharmacological. Toxicological Methods*, **58**, 11-26.
- (25)ICCVAM. (2010): ICCVAM test method evaluation report on the murine local lymph

node assay: DA, a nonradioactive alternative test method to assess the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. NIH Publication No. 10-7551. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences.

- (26)OECD (2010a): *OECD guideline for the Testing of Chemicals*, Test No.442A.: Skin sensitization: Local Lymph Node Assay:DA, adopted July 2010. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.
- (27)Takeyoshi, M., Yamasaki, K., Yakabe, Y., Takatsuki, M. and Kimber, I. (2001): Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicological Letter*, **119**, 203-208.
- (28)Takeyoshi, M., Sawaki, M., Yamasaki, K. and Kimber, I. (2003): Assessment of statistic analysis in non-radioisotopic local lymph node assay (non-RI-LLNA) with α -hexylcinnamic aldehyde as an example. *Toxicology*, **191**, 259-263.
- (29)OECD (2010c): *OECD guideline for the Testing of Chemicals*, Test No.442B.: Skin sensitization: Local Lymph Node Assay BrdU-ELISA, adopted July 2010. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.
- (30)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. *Toxicological Sciences*, **81**,332-343.
- (31)Gerberick, G.F., Vassallo, J. D., Foertsch, L. M., Price, B. B., Chaney, J. G. and Lepoittevin, J. P. (2007): Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Toxicological Sciences*, **97**: 417-427.
- (32)EC EURL-ECVAM (2013): Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay

(DPRA) for skin sensitisation testing. <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu>

- (33)OECD (2015): *OECD guideline for the Testing of Chemicals*, Test No.442C.: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) adopted February 2015 Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.
- (34)Natsch A. (2010): The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicological Sciences*, **113**, 284-292.
- (35)Emter R., Ellis G., Natsch A.(2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **245**, 281-290.
- (36)OECD (2015): *OECD guideline for the Testing of Chemicals*, Test No.442D.: *In Vitro* Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method adopted February 2015. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.
- (37)Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Itagaki, H., Miyazawa, M., Ito, Y. and Toyoda, H. (2006): Development of an in vitro skin sensitization test using human cell line activation test (h-CLAT).I. Optimization of the h-CALT protocol. *Toxicology in Vitro*, **20**, 767-773.
- (38)Sakaguchi, H., S., Ryan, C.A., Ovigne, J-M., Schroeder, K, R. and Ashikaga, T. (2010): Predicting skin sensitization potential and inter-laboratory reproducibility of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) in European Cosmetic Association (COLIPA) ring trials. *Toxicology*, **24**, 1810-1820.
- (39)Takenouchi, O., Miyazawa, M., Saito, K., Ashikaga, T. and Sakaguchi, H., (2013): Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic chemicals with high octanol-water partition coefficients. *Journal of Toxicological*

Science, **38**, No.4, 599-609.

- (40)OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. *OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168*. OECD, Paris.
- (41)Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P. S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M. and Sakaguchi, H. (2015): Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regulatory and Toxicology Pharmacology*, **71**, 337–351.
- (42)European Commission. (2003): DIRECTIVE 2003/15/EC OF THE EUROPIAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 27 February 2003, amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products, *Official Journal Ruropean Union*, L66/26.
- (43)Grindon, C., Combes, R., Cronin, T.D. M., Roberts, w. D. and Garrod, F. J. (2008): An integrated Decision-tree Testing Strategy for Skin Sensitization with Respect to the Requirements of the EU REACH Legislation. *Alternatives to Laboratory Animals*, **36**, Suppl. 1, 75-89.
- (44)Basketter, D. A., Ball, N., Ball., Cagen, S., Carillo, J-C., Certa, H., Eigler, D., Carcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009): Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitization datasets: Implications for REACH. *Regulatory and Toxicology Pharmacology*, **55**, 90-96.
- (45)Gerberich, G. F., Ryan, C. A., Kern P. S., Schlatter, H., Dearman, R. J.,Kimber, I., Patlewicz, G. Y. and Basketter. D. A. (2005): Compilation of Historical Local Lymph Node Data for Evaluation of Skin Sensitization Alternative Methods. *Dermatitis*,

Vol.16, No. 4 (December), 157-202.

- (46) Kern P. S., Gerberich, G. F., Ryan, C. A., Kimber, I., Aptula, A. and Basketter. D. A.(2010): Local Lymph Node Data for the Evaluation of Skin Sensitization Alternatives: A Secound Compilation. *Dermatitis*, **Vol.21**, No. 1 (January/February), 8-32.
- (47) Loveless, S. E., Api, A.-M., Crevel, R.W.R., Debruyne, E., Gamer, S., Jowsey, I.R., Kern, P., Kimber, I., Lea, L., Liody, P., Mehmood, Z., Steiling, W., Veenstra, G., Woolhiser, M. and Hennes, C. (2010): Potency values from the local lymph node assay: application to classification, labeling and risk assessment. *Regulatory and Toxicology Pharmacology*, **56**, 54-66.
- (48) 宇野勝次 (1999): アレルギー性副作用, 107.
- (49) Loveless, S. E., Ladics, G.S., Gerberich, G. F., Ryan, C. A., Basketter. D.A., Scholes, E.W., House, R.V., Hilyon, J., Dearman, R. J. and Kimber, I.(1996): Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial. *Toxicology*, **108**, 141-152.
- (50) Basketter. D.A., Ball, N., Gagen, S., Carrillo, J-C., Certa, H., Eigler, D., Garcia C., Esch, H., Emter, R., Graham, C., Haux, C., Kreiling. R. and Mehling, A. (2009): Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitization datasets: Implication for REACH. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **55**, 90-96.
- (51) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, D., Lee, M.S., Griem, P., Dreeßen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008): Comparison of the skin sensitizing potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 1896–1904

- (52)Ulrich, P. and Vohr, H-W. (2008): Utilization of Irritation Data in Local Lymph Node Assay. *Marzulli and Maibacha's Dermatotoxicology. 7th Edition.* 707-712.
- (53)Ezendam, J., Vermeulen, P., Klerk, A.d., Jong, W-H.D. and Loveren H. V. (2012): A quantitative approach to assess the potency of skin sensitizers in the elicitation phase. *Toxicology*, **299**, 20-14.
- (54)Ideahra, K. (2013): Publication of Japanese Patent Application, Publication number, 2013-072692
- (55)金森幸男、金子勝美、渡理英二、川名誠司(2012): アレルギー性接触皮膚炎の感作相は少なくとも2つのステップより構成され、その完成は皮膚の抗原に対する反応性の向上に重要である。日医大医学会誌, **8(3)**, 199-206.
- (56)Tse, H. Y., Ronald, Schwartz, H. and Paul, W. E. (1980): Cell-Cell interactions in the T Cell proliferative response, I. Analysis of the Cell types involved and evidence for nonspecific T Cell recruitment. *Journal of Immunology*, **125**, No.2, 491-500.
- (57)Gracia, C., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J-C., Certa, H., Eigler, D., Esch, H., Graham, C., Haux, Carl., Kreilling, R. and Mehling, A. (2010): Comparative testing for the identification of skin-sensitizing potentials nonionic sugar lipid surfactants. *Regulatory and Toxicology Pharmacology*, **58**, 301-307.
- (58)Basketter, D. A., Rodford, R., Kimber, I., Smith, L. and Wahlberg, J. E. (1999): Skin sensitization risk assessment: a comparative evaluation of 3 isothiazolinone biocides. *Contact Dermatitis*, **40**, 150-154.
- (59)Basketter, D. A., Lea, L. J., Cooper, K. J., Ryan, C. A., Gerberick, G. F., Dearman, R. J. and Kimber, I. (1999b): Identification of metal allergens in the Local Lymph Node assay. *American Journal of Contact Dermatitis*, **10** (4) December, 207-212.
- (60)Anzai, T., Ullmann, L.G., Hayashi, D., Satoh, T., Kumazawa, T and Sato, K. (2010): Effect of Strain Differences and Vehicle on Results of Local Lymph Node

Assays. *Experimental Animals*, **59**(2), 245-249.

- (61) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H. and Stokes, W.S. (2001): ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Regulatory and Toxicology Pharmacology*, **34**, 274-286.
- (62) Nukada, Y., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Hirota, M., Sakaguchi, H., Sasa, H. and Nishiyama, N. (2012): Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicology in Vitro*, **26**, 1150-1160
- (63) Basketter, D. A., Scholes, E.W. and Kimber, I. (1994): The performance of the local lymph node assay with chemicals identified as contact allergens in the human maximization test. *Food and Chemical Toxicology*, **32**, 543-547.
- (64) Garcia-Peres, A. (1978): Occupational dermatitis from DNFB with cross sensitivity to DNCB. *Contact Dermatitis*, **4**, 125-127.
- (65) Basketter DA, Goodwin BF. (1988) Investigation of the prohaptens concept. Cross reactions between 1,4-substituted benzene derivatives in the guinea pig. *Contact Dermatitis*, **19**(4), 248-253.
- (66) 政本幸三 (2001): 単純クマリン類の感作性及び交差感作性. 薬学雑誌, **121**(1), 97-103.
- (67) 松永佳世子、富高晶子、秋田浩隆 (2001): ラテックスフルーツ症候群. 口腔科, **13**(3), 311-317.
- (68) 大津友子、石津澄子 (1983): トリレン・ジイソシアネートの皮膚感作性に関する実験的研究. 東女医大誌, **53**(3), 273-277
- (69) Eisen, H.N. and M. Tabachnick, (1958): Elicitation of allergic contact dermatitis in the guinea pig. *The Journal of experimental Medicine*, **108**, 773-796.

- (70)中川昌次郎、谷奥喜平 (1979): 接触過敏症における抗原分布について. 臨報, **33**(1), 9-17
- (71)Anguita, J.L., Escutia, B., Marí, J.I., Rodríguez, M., De La Cuadra, J. and Aliaga, A. (2002): Allergic contact dermatitis from undecylenic acid in a commercial antifungal nail solution. *Contact Dermatitis*, **46**, 109.
- (72)Pappinen, S., Pasonen-Seppänen, Suhonen, M., Tammi, R., and Urtti, A. (2005): Rat epidermal keratinocyte organotypic culture (ROC) as a model for chemically induced skin irritation testing. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **208**, 233–241.
- (73)Boelsma, E., Tanojo, H., Boddé, H.E. and Ponc, M. (1996): Assessment of the potential irritancy of oleic acid on human skin: evaluation in vitro and in vivo. *Toxicology in Vitro*, **10**, 729–742.
- (74)Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Groves, R.W., Antonopoulos, C. and Kimber, I. (2002): Differential regulation of epidermal Langerhans cell migration by interleukins (IL)-1alpha and IL-1beta during irritant- and allergen-induced cutaneous immune responses. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **182**, 126–135.
- (75)Yamashita, S., Segawa, R., Satou, N., Hiratsuka, M., Leonard, W.J. and Hirasawa, N. (2013): Induction of thymic stromal lymphopoietin production by nonanoic acid and exacerbation of allergic inflammation in mice. *Allergology International*, **62**, 463–471.
- (76)Satou, N., Ishihara, K., Hiratsuka, M., Tanaka, H., Endo, Y., Saito, S., Iwakura, Y., Leonard, W.J. and Hirasawa, N. (2012): Induction of thymic stromal lymphopoietin production by xylene and exacerbation of picryl chloride-induced allergic inflammation in mice. *International Archives of Allergy and Immunology*, **157**, 194–201.

- (77)Angelova-Fischer, I., Fernandez, I.M., Donnadieu, M.H., Bulfone-Paus, S., Zillikens, D., Fischer, T. W. and Soumelis,V. (2010): Injury to the stratum corneum induces in vivo expression of human thymic stromal lymphopoietin in the epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, **130**, 2505–2507.
- (78)Basketter, D. A., Gerberick, G. F. and Kimber, I. (1998): Strategies for Identifying False Positive Responses in Predictive Skin Sensitization Tests. *Food and Chemical Toxicology*, **26**, 327-333.
- (79)Basketter, D.A., Alepee, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Gilmour, N., Goebel, C., Hibatallah, J., Hoffmann, S., Kern, P., Martinozzi-Teissier, S., Maxwell, G., Reisinger, K., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M. and Templier, M. (2014): Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatitis*, **25**, 11–21.
- (80)Natsch, A., Ryan, C.A., Foertsch, L., Emter, R., Jaworska, J., Gerberick, G. F. and Kern, P. (2013): A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, **33** (11), 1337–1352.
- (81)Bauch, C., Kollé, S.N., Ramirez, T., Eltze, T., Fabian, E., Mehling, A., Teubner, W., van Ravenzwaay, B. and Landsiedel, R.(2012): Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials. *Regulatory and Toxicology Pharmacology*, **63**, 489–504.
- (82)友田隆子、岸本伸子、井口伸子、宇山昌延、西嶋撰子、河村甚朗。(1985): 散瞳点眼剤による外眼部アレルギー反応。臨眼, **39**(1), 57-61
- (83)山田利津子、山田誠一、中村正夫、竹林英一郎。(1988): 点眼剤の保存剤塩化ベンザルコニウムによる過敏反応を認めた 1 症例。眼科臨床医報, **82**(3), 470-472.
- (84)Ersoy, M., Tanalp, J., Ozel, E., Cengizlier, R. and Soyman, M. (2008): The allergy of

- toothpaste: a case report. *Allergologia et Immunopathologia*, **36**(6), 368-70.
- (85) Lee, A-Y., Yoo, A-H., Oh, J-G. and Kim Y-G. (2000): 2 cases of allergic contact cheilitis from sodium lauryl sulfate in toothpaste. *Contact Dermatitis*, **42**, 111.
- (86) Ball, N., Gagen, S., Carrillo, J-C., Certa, H., Eigler, D., Emter, R., Faulhammer, F., Garcia C., Graham, C., Haux, C., Kolle, S.N., Kreiling, R. Natch, A and Mehling, A. (2011): Evaluating the sensitization potential of surfactants: Integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and in vitro methods in weight-of-evidence approach. *Regulatory and Toxicology Pharmacology*, **60**, 389-400.
- (87) Ahn, Y. and Kim, S-H. (2004): Anaphylaxis Caused by Benzalkonium in a Nebulizer Solution. *Journal of Korean Medical Science*, **19**, 289-290.
- (88) Aleksic, M., Pease, C.K., Basketter, D.A., Panico, M., Morris, H.R. and Dell, A. (2007): Investigating protein haptentation mechanisms of skin sensitizers using human serum albumin as model protein. *Toxicology in Vitro*, **21**, 723-733.
- (89) Ahlfors, E.E., Dahl, J.E. and Lyberg, T. (2012): The development of T cell-Dominated inflammatory response induced by sodium lauryl sulphate in mouse oral mucosa. *Archives oral biology*, **57**, 796-804
- (90) Ying, S., O'connor, B. and Ratoff, J. (2005): Thymic stromal lymphoprotein expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *Journal of Immunology*, **174**, 8183-8190.
- (91) 有馬和彦. (2011): アレルギー発症における thymic stromal lymphoprotein (TSLP) の作用. *生化学*, **83**(23), 1109-1113.
- (92) 平澤典保. (2011): キシレン・トリメチルベンゼンによる表皮からの TSLP 産生誘導. *Clinical Immunology & Allergy Now*, **56**(5), 478-484.
- (93) Angelova-Fischer, I., Fernandes, I.M., Donnadieu, M-H., Bulfone-Paus, Silvia.,

Zillikens, D., Fischer, T.W. and Soumelis, V. (2010): Injury to the Stratum Corneum Induces In Vivo Expression of Human Thymic Stromal Lymphopoietin in Epidermis. *Journal of Investigation Dermatology*, **Vol.30**, 2505-2507.

(94)Antonio, R. and Gasset, M. D. (1977): Benzalkonium chloride toxicity to the human cornea. *Americal Journal of Ophthalmology*, Aug. 169-171.

(95)泉裕子、山出良一.(2009): 下眼賢瞼の硬結を主徴とした点眼剤中の塩化ベンザルコニウムによる接触皮膚炎. *皮膚病診療*, **31**(11). 1271-1274

付記

本論分の内容は、下記に示す投稿論文より構成される。

山下邦彦, 篠田伸介, 萩原沙織, 板垣宏

塩化ベンザルコニウム及びラウリル硫酸ナトリウムのアレルギー様反応誘発可能性に関する検討, 日本職業・環境アレルギー学会雑誌,2016, 23 巻 2 号,15-24

Kunihiko Yamashita, Shinsuke Shinoda, Saori Hagiwara and Hiroshi Itagaki: Quantitative analysis of the relationship between the LLNA:DAE method results and the LLNA EC3 values highlights the connection between the elicitation and induction phases during skin sensitization. Fundamental Toxicological Sciences, 2016, Vol3, No. 1, 27-31

Kunihiko Yamashita, Shinsuke Shinoda, Saori Hagiwara, Hiroshi Miyazaki and Hiroshi Itagaki: Unsaturated fatty acids show clear elicitation responses in a modified local lymph node assay with an elicitation phase, and test positive in the direct peptide reactivity assay. The Journal Toxicological Science, 2015, Vol40, No.6, 843-853

Kunihiko Yamashita, Shinsuke Shinoda, Saori Hagiwara and Hiroshi Itagaki: Further development of LLNA:DAE method as stand-alone skin-sensitization testing method and applied for evaluation of relative skin-sensitizing potency between chemicals. The Journal Toxicological Science, 2015, Vol40, No.2, 137-150.

Kunihiko Yamashita, Shinsuke Shinoda, Saori Hagiwara and Hiroshi Itagaki: Development of LLNA:DAE: A new local lymph node assay that includes the elicitation phase, discriminates borderline-positive chemicals, and is useful for cross-sensitization testing. The Journal Toxicological Science, 2014, Vol39, No.1, 147-161