# 皮膚感作性試験代替法 h-CLAT(エイチ・クラット)の開発

株式会社 資生堂 花王株式会社

### 皮膚感作(皮膚アレルギー)とは

皮膚に化学物質が接触し、体が異物として認識すると、 次に接触した時に起こる炎症反応(遅延型炎症反応)

原因物質は天然物由来化合物から合成化合物、金属まで様々

原因物質の例:

金属(ニッケル、プラチナなど) 植物(うるし、サクラソウなど)

#### 皮膚感作性(皮膚アレルギー性)試験とは

皮膚に化学物質が接触し、体が異物として認識すると、 次に接触した時に起こる

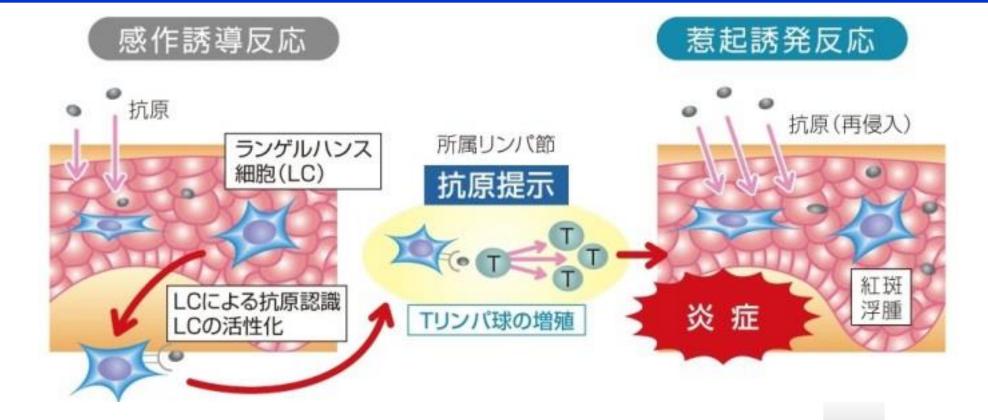
皮膚感作性(遅延型炎症反応)を調べる試験

これまでは動物実験として以下の2試験が主に行われていた。 モルモットを用いるGPMT (Guinea pig Maximization Test) マウスを用いるLocal Lymph Node Assay (LLNA)

- ▶ 化学物質の安全性担保において重要な評価(試験)項目
- ➤ REACH(※)などの化学物質登録においても要求さている

※REACH: リーチ、リーチ法、Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of CHemicals 欧州連合における人の健康や環境の保護のために化学物質とその使用を管理する 欧州議会及び欧州理事会規則

# 皮膚感作(アレルギー)のメカニズムと試験法



試験法

in vitro test

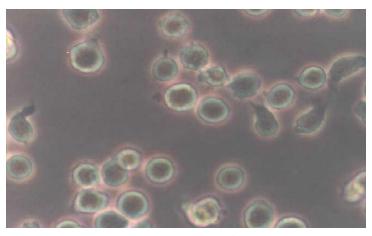
ex vivo test

LLNA (OECD TG429) in vivo test

GPMT (OECD TG406)

#### "THP-1 細胞"に関する発見と共同研究の開始

# 資生堂、花王はそれぞれ THP-1細胞が皮膚感作性試験の指標となることを発見



THP-1細胞 (monocytic leukemia cell line) サイトカイン処理などで 樹状細胞に分化可能

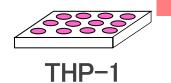
- THP-1などのヒト単球細胞株
- 感作性物質が存在すると、ランゲルハンス 細胞などの樹状細胞同様に抗体である CD86/CD54の発現を高める\*
  - \*: Ashikaga et.al., Toxicology in Vitro, 16, 711-716, 2002.(資生堂) Yoshida et al., Toxicology in Vitro, 17, 221-228, 2003.(花王)



2003年1月より共同研究を開始

### 共同開発した皮膚感作性試験法"h-CLAT"

#### 方法



1x106 cells /mL

24時間

被験物質曝露 CV75(※1)を基準とした8濃度 ※1 CV75: 細胞生存率が75%になる濃度 プローサイトメーター(※2)による解析 抗体染色(CD86 & CD54)

FcR ブロッキング

※2 フローサイトメーター: 単一の細胞(細胞、細菌等)の複数の 特徴を同時に高速で測定する装置

● 抗体の蛍光強度比(RFI: Relative Fluorescence Intensity)

RFI =

被験物質処理群のCD86/CD54)のMFI −被験物質処理群のisotype control MFI

- X 100

溶媒処理群のCD86/CD54のMFI -溶媒処理群のisotype control MFI

MFI (Mean Fluorescence Intensity): 平均蛍光強度

#### ● 予測モデル

細胞生存率 ≥ 50% (Propidium Iodideにて染色)

陽性判定基準值: CD86 RFI ≥ 150% and/or CD54 RFI ≥ 200%

結果判定: 3回中2回の試験において、いずれかの濃度で陽性判定基準値を超えた場合陽性

# "h-CLAT"と命名

human Cell Line Activation Test, 上上細胞株活性化試験

#### h-CLATの予測性の検証(LLNAデータとの比較)

#### LLNA

- Dr. Ian Kimber らによって開発されたマウス局所リンパ節増殖試験(Local lymph node assay; LLNA)
- ・従来の皮膚感作性試験とは異なり、初回抗原刺激によるリンパ節の増殖反応を指標にし、短期間に化 学物質の感作性を推定できる皮膚感作性試験法
- 本法は2002 年にOECD の テストガイドライン (OECD TG429)として 登録された

LLNA (国際標準)	+(85)	75	10
	-(32)	8	24

Sensitivity: 75/85 (88%)

+(83)

h-CLAT

-(34)

Specificity: 24/32 (75%)

Positive predictivity: 75/83 (90%)

Negative predictivity: 24/34 (71%)

Accuracy: 99/117 (85%)

# 感作性の有無の予測精度は良好(国際標準と同等)

Nukada et al., WC7 2009, Ashikaga et al., ATLA 2010, Nukada et al., Contact Dermatitis 2011

#### 国際標準化に向けた取り組み

#### OECDガイドライン化までの流れ

欧州代替法評価センターの 資料(1997)より一部改変

試験法開発

多施設間での (有用性)評価

バリデーション 〉ピフ

ピアレビュー

**国際標準** OECDガイドライン

- ・プロトコール策定
- •予測精度確認
- •施設間再現性確認

試験法の有効性、再現性、技術移転難易度、等を検証

OECD: 経済協力開発機構

#### ECVAM(※1)でのバリデーション (妥当性検証)

- 公的な専門機関による客観的な評価
- JaCVAM(※2)がh-CLATをサポート
- 2009年10月開始⇒2012年11月実験終了

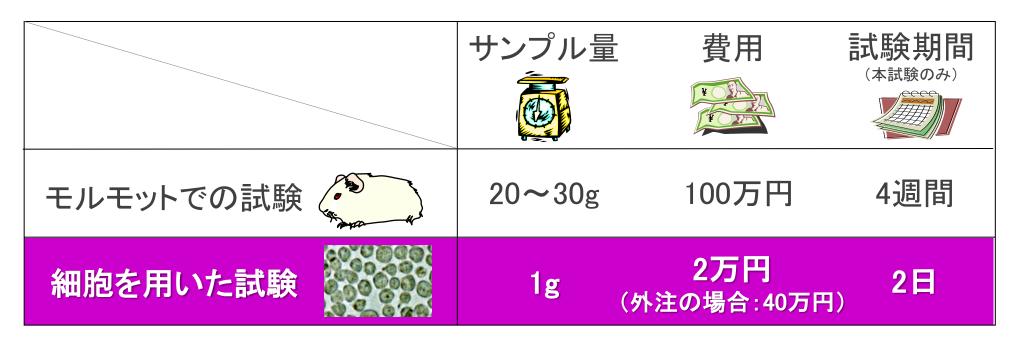
# 2015年・OECDガイドライン化を目指す

国際標準としてREACHなど公的申請への活用の期待

※1 ECVAM: European Center for the Validation of Alternative Methods、欧州動物実験代替法評価センター

※2 JaCVAM : Japanese Center for the Validation of Alternative Methods、日本動物実験代替法評価センター

#### 代替法のメリット



#### 受託可能な施設

- 日本: 食品薬品安全センター、ニコダームリサーチ
- ヨーロッパ: Bioassay(ドイツ)、ドイツの受託機関(計画中) など
  - 少量・低コスト・時短
  - 化学物質(全般)のスクリーニングにも有用

#### まとめ

- > 動物を使用しない代替試験法の開発は時代の要請
  - 化学物質の安全性評価は必然・必須 これまでの動物実験は倫理面だけでなく効率性の観点からも課題あり
- ▶ 国際標準・OECDガイダンス化(見込み)
  - h-CLATは欧州委員会が主導するバリデーションの対象試験法に決定米州発の試験法(DPRA)と欧州発の試験法(KeratinoSens)との組合せ
- ➤ "h-CLAT"は化学物質の安全性評価に大きく貢献
  - 対象は化粧品原料にとどまらない すでに、医薬品や医療材料などの評価、アレルギーの基礎研究など幅広く応用