

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤 C
研究期間：平成18年度～平成20年度
課題番号：18590132
研究課題名（和文） 生活関連化学物質の皮膚感作性等のインビトロ評価法に関する研究
研究課題名（英文） Study of <i>in vitro</i> evaluation method of skin sensitization inducing environmental chemical
研究代表者 内野 正 (UCHINO TADASHI) 国立医薬品食品衛生研究所・環境衛生化学部・主任研究官 研究者番号：40232863

研究成果の概要：コラーゲンビトリゲル薄膜を培養担体とし、免疫担当細胞を含む新規な3次元培養ヒト皮膚モデルを開発した。このモデルに、皮膚感作性物質及び非感作性物質を暴露してサイトカイン放出量及び免疫担当細胞の表面抗原発現強度を測定して判定した結果、動物を用いた *in vivo* 法での、皮膚感作性の評価結果と相関し、本法が皮膚感作性の動物実験代替法となり得ることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	1,200,000	0	1,200,000
平成19年度	1,100,000	0	1,100,000
平成20年度	1,100,000	90,000	1,190,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	90,000	3,490,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：レギュラトリーサイエンス

1. 研究開始当初の背景

皮膚は全身を覆う器官であり、化学物質や紫外線等様々な刺激に曝されている。これらの刺激から皮膚を守り、ホメオスタシスを保つために角層による防御作用、樹状細胞等による免疫反応などがある。近年生活関連化学物質の増加等、皮膚に暴露される刺激の増加によりアレルギー性皮膚炎等の皮膚ホメオスタシス破壊が原因と思われる疾患が増加の傾向にある。これらの化学物質の皮膚アレルギー性を評価する指標の一つに皮膚感作性試験法が挙げられるが、これまでは guinea pig maximization test (GPMT) などモルモットを用いた試験法により評価されてきた。しか

し、これらの試験法は肉眼的観察による皮膚反応で評価するため定量性や再現性に乏しいこと、また動物への長期間のストレスが物愛護の点から問題となっていた。欧州を中心に 3R(Replacement: 実験材料としての動物を他のもので置き換えること、Reduction: 実験方法を工夫して使用動物数を減らし、また実験期間の短縮を図ること、Refinement: 使用動物の苦痛を軽減すること) を目標とする動物実験代替法開発の動きが広がり、Reduction の観点からマウスを使用し、これまでより短期間に試験出来る Local Lymph Node Assay (LLNA) が開発された。欧米で実施されたバリデーション研究の結果、OECD の安全性試験

法ガイドラインとして LLNA が承認された (OECD Guideline 429. Skin sensitization: Local Lymph Node Assay, 2002)。LLNA は感作性物質による所属リンパ節細胞の増殖反応を放射性物質(RI)の ^3H -thymidine の取り込み量を指標として評価するが、RI 管理の厳しい我が国では普及が進んでいなかった。我が国では、この欠点を改良した ATP を指標とする評価法(LLNA-DA)やプロモデオキシウリジンを指標とする評価法(LLNA-BrdU)等 RI を用いない LLNA 改良法がいくつか開発され、バリデーションが進行し、その試験法の有用性が提案されている。

一方で、欧州においては化粧品に用いる成分の安全性評価に動物を用いた試験が禁止されることになっており、動物を用いない *in vitro* の皮膚感作性試験法開発が急務となっている。近年、単層培養したヒト樹状細胞を用いる方法等が提案されてきているが、こうした *in vitro* 法の有用性を確認するには *in vivo* 法との相関性を比較することが重要である。そのためには *in vivo* 皮膚感作性試験法の定量的な結果が必要であり、LLNA 法でのデータが最も適切と考えられる。

我々は既に皮膚感作性の *in vitro* 評価法を開発するために、正常ヒト皮膚繊維芽細胞、ヒト表皮角化細胞、正常ヒト樹状細胞からなる 3 次元培養ヒト皮膚モデル(KDF-Skin)を構築し、細胞断面を HE 染色及び免疫染色して角層の形成及び樹状細胞の表面抗原の CD86 の発現を確認した。そして DNCB, DNFB など 6 種類の皮膚感作性物質及び 4 種類の非感作性物質を暴露した結果、CD86 の発現強度が LLNA 法と相関性が見られたという知見を得ている。しかし、線維芽細胞を播種したコラーゲンゲルの収縮に 1 週間、皮膚モデルの構築に約 3 週間要するため、より短期間で効率的に構築出来る新しい皮膚モデルの開発が求められていた。

2. 研究の目的

in vitro 皮膚感作性試験法を確立するために、まず新しい培養担体から成る 3 次元培養ヒト皮膚モデル(VG-KDF-Skin)を構築する。次に、この皮膚モデルを用いて生活関連化学物質の皮膚感作性を評価し、*in vivo* 法の LLNA 法及びその改良法と比較した。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 試験法

細胞：正常ヒト線維芽細胞(NHSF46)は独立行政法人理化学研究所細胞バンクより購入した。正常ヒト樹状細胞(末梢血由来:NHDC)は Cambrex 社より購入した。正常新生児表皮角化細胞[NHEK(F)]はクラボウ社より購入した。

試験物質：8 種類の皮膚感作性物質 cinnam-

aldehyde (CA), CoCl_2 , 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB), α -hexylcinnamaldehyde (HCA), HCHO, isoeugenol, glutaraldehyde 及び 4 種類の非感作性物質 [dimethylsulfoxide (DMSO), isopropanol, sodium dodecyl sulfate (SDS), polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween 80)]を用いた。

3 次元培養ヒト皮膚モデルの構築法及び皮膚感作性試験法：図 1 に示すように、紫外線 (UV-C: 254 nm) を 800 mJ/cm^2 照射したコラーゲンビトリゲル(Collagen vitrigel)薄膜を 6 穴プレート内のアッセイリングの上に置いた。ゲル薄膜に NHSF46 を 5×10^4 cells/well 播種し、2~4 時間培養後、ゲル薄膜を反転させ、ゲル薄膜表面に置いたガラスリング内に I 型コラーゲンゲルに分散させた NHDC (1×10^5 cells/well) を播種した。2 時間培養し、コラーゲンゲルを固化させた後、NHEK(F) を 2×10^5 cells/well 播種し 1 日培養後、線維芽細胞、樹状細胞、角化細胞用の培地を等量混合し、かつ角化細胞を分化させるために高濃度のカルシウムを含む培地 (3 次元培養用培地) を 2 ml 添加し、1 日培養した。次に、角化細胞表面を空気に曝しながら 13 日間培養し、皮膚モデルを作製した。これに被験物質 (皮膚感作性物質 8 種及び非感作性物質 4 種) を 1 時間暴露させ、24 時間後 10% 中性緩衝ホルマリンで固定し、HE 染色及び CD86 免疫染色した。また培養上清を採取し、IL-1 α 及び IL-4 放出量を ELISA キットで測定した。

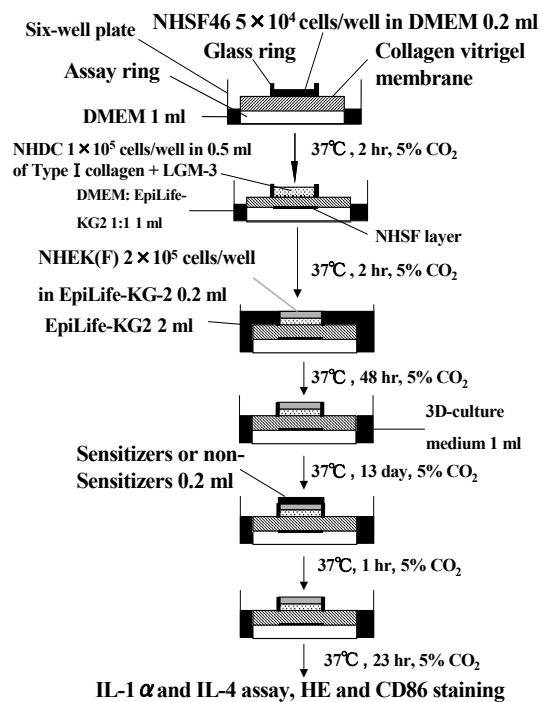


図1 VG-KDF Skinの構築法

評価：CD86 発現強度は-(青), ± (灰色), + (薄茶色), +~++ (茶色), ++ (濃い茶色) の5段階で評価し、コントロールよりも強い発色が見られた場合を皮膚感作性陽性とした。サイトカイン放出量はコントロールの150%以上の放出が見られた場合を皮膚感作性陽性とした。

(2) *in vivo* 試験法

試験物質： CA, cinnamic acid, cinnamyl alcohol, α -methylcinnamaldehyde (MCA), α -pentylcinnamaldehyde (PCA)及び HCA を用いた。更に、DNCEB, nickel sulfate, eugenol, methyl salicylate 及び isopropanol を試験した。試験物質はアセトン・オリーブ油(4:1) (AOO), DMSO, ジメチルホルムアミド等に溶解し、指定適用濃度とした。

LLNA-DA 法：マウスの両耳に SDS 溶液を塗布した後、試験溶液を塗布した。この操作を1, 2, 3 及び7日目に行った。8日目に耳介リンパ節を摘出して重量を測定した後、リンパ節細胞(LNC)を遊離させ、LNCのATP含量をルシフェリン・ルシフェラーゼ反応による発光量(RLU)から測定した。

LLNA-BrdU 法：試験溶液を3日間連続でマウスの両耳に塗布、4日目に BrdU 溶液を腹腔内注射した。翌日耳介リンパ節の重量を測定後、LNC 浮遊液を調製し、BrdU 取り込み量を市販 ELISA キットによる吸光度の変化から求めた。

評価：LLNA-DA 法では試験群の溶媒群に対する ATP 含量の増加率(stimulation index, SI)が3以上、LLNA-BrdU 法では吸光度の SI が2以上になったときを皮膚感作性陽性と判定した。

4. 研究成果

図2に構築した3次元培養ヒト皮膚モデルの写真(表面を空気に曝した直後のもの)を示す。外側の白い円がアッセイリング、その内側の部分が NHSF46 を播種したコラーゲンビトリゲル薄膜、その内側の透明なリングがガラスリングとなっており、その内側に NHDC と NHEK(F) を播種したコラーゲングルがある。

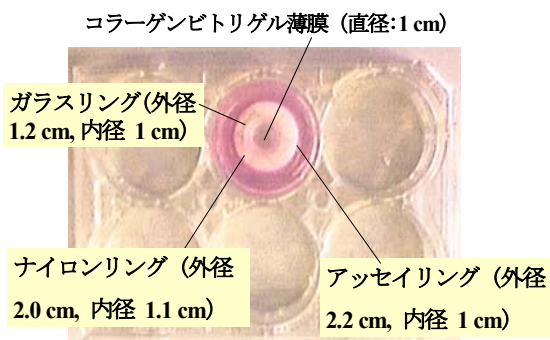
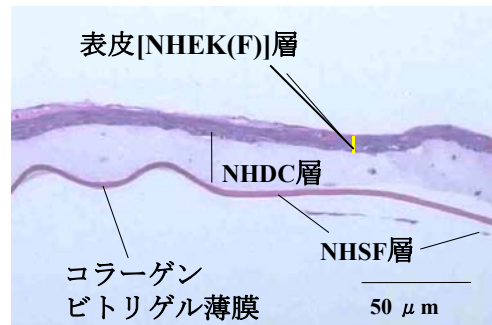
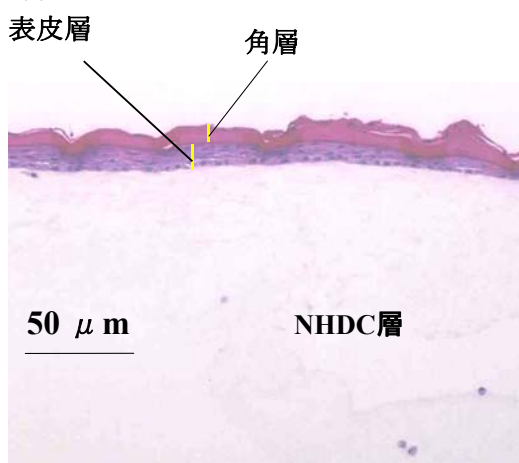


図2 VG-KDF-Skin

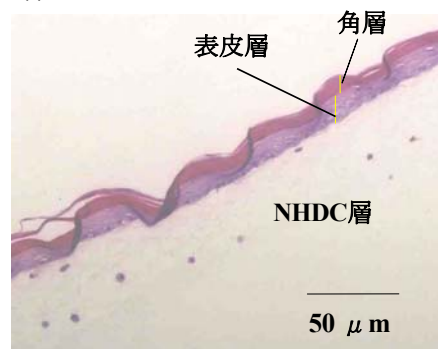
(a) 培養3日後



(b) 培養7日後



(c) 培養14日後



(d) 培養21日後

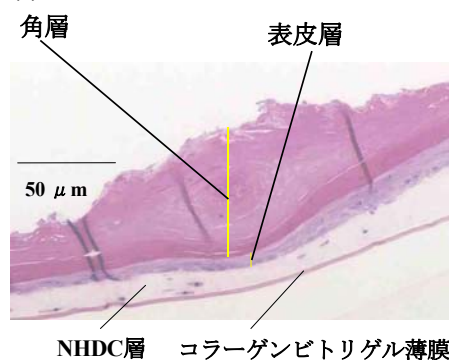
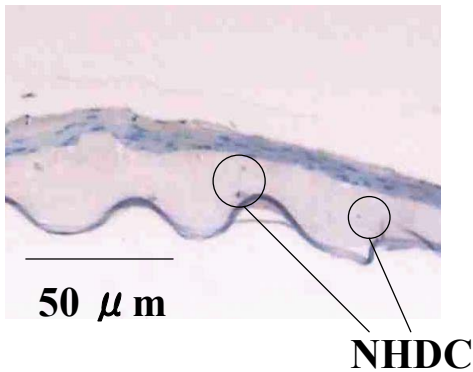
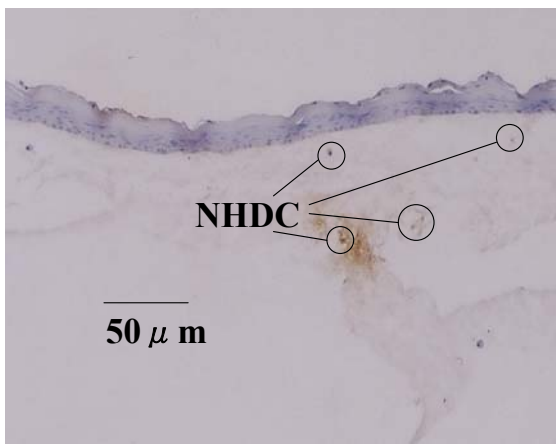


図3 皮膚モデルの断面図

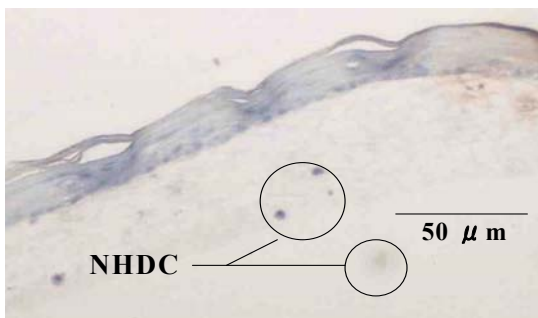
(a) 培養3日後, CD86発現強度: ±



(b) 培養7日後, CD86発現強度: +~++



(c) 培養14日後, CD86発現強度: ±



(d) 培養21日後, CD86発現強度: -

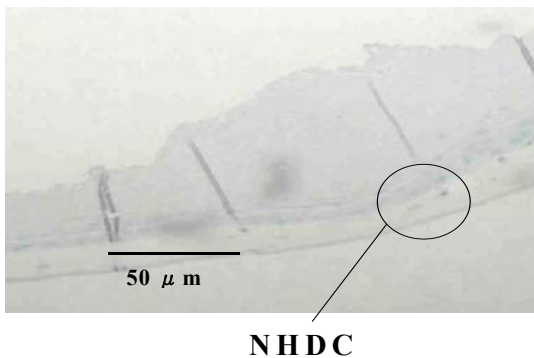


図4 皮膚モデルの免疫染色画像

表面を空気に曝してから3~21日後のVG-KDF-Skinの断面をHE染色した(図3)。3日後には表皮細胞層が5層程度形成されるものの、角層の形成は認められなかった。7日後、に表皮細胞層が7層程度に増加し、角層の形成も観察された(図3-a,b)。14日後には表皮細胞層及び角層ともに増加するが、21日後には角層は更に増加するものの、表皮細胞層は5層以下と減少に転じた(図3-c,d)。同様にCD86免疫染色した所、CD86の発現は7日後に最も強くなるが、14日後には弱くなり、21日後に消失した(図4)。このため、角層と表皮細胞層の層数が生体(10層程度)に最も近いと思われる、表面を空気に曝してから14日後に皮膚感受性の評価を行うこととした。

図5に示すように、皮膚は感受性物質に暴露されると、ケラチノサイトよりIL-1α, 2, 4等のサイトカインが分泌され、樹状細胞が活性化し、細胞膜表面抗原のCD86を発現する。活性化された樹状細胞は真皮層に遊走し、T細胞に抗原提示を行う。するとT細胞からIL-4等のサイトカインが分泌され、皮膚感受性が誘導される。また活性化した樹状細胞はIL-4等のサイトカインを分泌して線維芽細胞を活性化し、IL-1αを分泌させてT細胞を活性化させる。上記の知見から、上述のように構築されたVG-KDF-skinの皮膚感受性の*in vitro*評価法の指標として、皮膚感受性物質暴露後の初期段階の反応であるCD86発現とサイトカイン(IL-1α, 4)放出を選択した。

樹状細胞 角化細胞 線維芽細胞からなる3次元培養と皮膚モデル

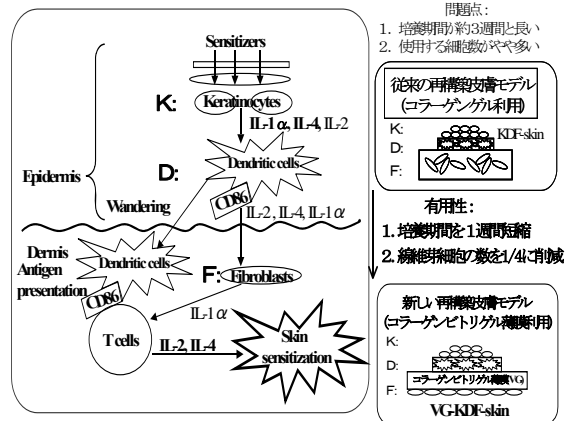


図5 皮膚感受性の*in vitro*評価法開発

表面を空気に曝してから13日後にDNCBを皮膚モデルに適用し、14日後に評価したところ、濃度依存的にCD86の発現強度の増加及びサイトカイン放出量の有意な増加が見られた(表1)。従来のモデル(KDF-Skin)より培養期間を1週間短縮でき、NHSF46の播種量は 5×10^4 cells/wellと、KDF-Skinの場合(2×10^5 cells/well)の1/4にすることができた。

表1 DNCBによるVG-KDF-Skinからのサイトカイン放出及びCD86発現の増強

	CD86 expression	IL-1α conc. (% of control)	IL-4 conc. (% of control)
control	±	100±8	100±18
DNCB 1 nmol/L	+	133±16*	140±36
DNCB 2 nmol/L	+~++	598±28***	262±91*

Data are means±S.D. of three to four values. CD86 expression strength ±=gray, += light brown, +~++=brown
Significantly different from control, * P<0.05, *** P<0.001
Cytokines release measured after 24-h incubation

7種類の皮膚感作性物質と2種類の非感作性物質を用いて皮膚感作性を *in vivo* の非RI-LLNA法で評価した結果をLLNA法と比較した(表2-a)。LLNA-DA法を用いて各種濃度のケイ皮化合物についてSI=3を示す濃度(EC3)を求めて皮膚感作性強度を順序づけた。ケイ皮化合物の皮膚感作性強度はCA>MCA>cinnamyl alcohol>HCA=PCAの順で、アルキル基が短いアルデヒドほど皮膚感作性は強く、LLNAと同様の結果が得られた。

Eugenolは弱い皮膚感作性物質であるが、LLNA-BrdU法では10%で陽性反応を示した。Nickel sulfateについてはLLNAで皮膚感作性を検出できないとの報告があるが、LLNA-BrdU法では陽性と判定された。2つの非RI-LLNA法での評価は、LLNA法と一致し、*in vitro*試験との比較のための定量的なデータとして用いられることが示唆された。

表2 VG-KDF Skinを用いた *in vitro* 皮膚感作性評価法の *in vivo* 評価法との相関性 (a) *in vivo* 皮膚感作性評価法

	LLNA ^a	LLNA-DA	LLNA-BrdU
CA	+	+	+ ^c
CoCl ₂	+	+ ^b	ND
DNCB	+	+	+
DNFB	+	ND	ND
HCA	+	+	+
HCHO	+	+ ^b	+ ^c
Isoeugenol	+	+ ^b	ND
Glutaraldehyde	+	+ ^b	+ ^c
DMSO	-	-	-
Isopropanol	-	-	-
SDS	false positive	ND	ND
Tween 80	-	ND	ND

a) The data from references 1-4.

1) NIH, The Murine Local Lymph Node Assay: NIH Publication No:99-4494, 1999

2) Basketter et al., Contact Dermatitis, 2000, 42, 344-348

3) Rayan C.A. et al., Food and Chemical Toxicol, 2002, 40, 1719-1725

4) Karen E. H. et al., Regulatory and Pharmacology, 2001, 34, 274-286

b) The data from Takeyoshi et al., AATEX, 2008, 13(supplement), 202

c) The data from Ohmori et al., J. Pharmacol. Toxicol. Methods, 2008, 58, 11-26
ND=no data

(b) *in vitro* 皮膚感作性評価法

	CD86 expression ^d	IL-1α release ^c	IL-4 release ^c
CA	+	+	+
CoCl ₂	+	-	+
DNCB	+	+	+
DNFB	+	+	+
HCA	+	+	+
HCHO	+	-	+
Isoeugenol	-	+	+
Glutaraldehyde	-	-	+
DMSO	-	-	-
Isopropanol	-	-	-
SDS	-	+	-
Tween 80	-	+	-
Accuracy (vs. LLNA)	83% (10/12)	57% (7/12)	92% (11/12)
Accuracy (vs. LLNA-DA)	78% (7/9)	67% (6/9)	89% (8/9)
Accuracy (vs. LLNA-BrdU)	86% (6/7)	71% (5/7)	100% (7/7)
Sensitivity (vs. LLNA)	75% (6/8)	63% (5/8)	88% (7/8)
Sensitivity (vs. LLNA-DA)	71% (5/7)	57% (4/7)	86% (6/7)
Sensitivity (vs. LLNA-BrdU)	80% (4/5)	60% (3/5)	100% (5/5)
Specificity (vs. LLNA)	100% (4/4)	50% (2/4)	100% (4/4)
Specificity (vs. LLNA-DA)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)
Specificity (vs. LLNA-BrdU)	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)

d) + :increased compared to control, c) + :over 150% compared to control

8種類の皮膚感作性物質と4種類の非感作性物質を用いてCD86発現強度及びサイトカイン放出量を測定し、*in vivo*試験法での結果と比較した。その結果、*in vitro*試験法としてIL-4放出量を指標とした時の*in vivo*試験法との一致率が89-100%、感度が86-100%と最も高く、次いでCD86発現強度を指標とした時の一致率が78-86%、感度が71-80%であった。一方、IL-1α放出量を指標とした時の一致率は57-71%、感度が57-63%と低い値を示した(表2-b)。従ってIL-4放出量を指標として用いた*in vitro*試験法が皮膚感作性の動物実験代替法に適用出来ることが示唆された。

以上、コラーゲンビトリゲル薄膜上に構築した3次元培養ヒト皮膚モデル(VG-KDF-Skin)からのIL-4放出量を判定指標とする本試験法は化学物質の*in vitro*皮膚感作性評価法として有用であることがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

① Uchino, T., Takezawa, T., Ikarashi, Y. Reconstruction of three-dimensional human skin model composed of dendritic cells, keratinocytes, and fibroblasts utilizing a handy scaffold of collagen vitrigel membrane, Toxicol. In Vitro, 23, 333-337, 2009, 有

② 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., Yuasa, A., Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement, J. Pharmacol. Toxicol. Methods, 58, 11-26, 2008, 有

③ 内野 正, コラーゲンビトリゲル薄膜を用いた3次元培養ヒト皮膚モデルの構築とその皮膚感作性試験への応用、バイオインダストリー、25巻、34-39, 2008, 有

④ 竹澤 俊明, 生体内環境を反映した細胞培養担体の開発とその再生医療あるいは創薬研究への応用構想、バイオインダストリー、25巻、8-16, 2008, 有

⑤ Takezawa, T., Nitani, A., Shimo-Oka, T., Takayama, Y., A protein-permeable scaffold of a collagen vitrigel membrane useful for reconstructing crosstalk models between two different cell types, Cells Tissues Organs, 158, 237-241, 2007, 有

⑥ Takezawa, T., Takeuchi, T., Nitani, A.,

Takayama, Y., Kino-Oka, M., Taya, M., Enosawa, S., Collagen vitrigel membrane useful for paracrine assays in vitro and drug delivery systems in vivo, Journal Biotechnology, 131, 76-83, 2007, 有

〔学会発表〕(計 10 件)

① 内野 正、竹澤俊明、五十嵐良明、西村哲治、コラーゲンビトリゲル薄膜を用いた 3 次元培養ヒト皮膚モデルの *in vitro* 皮膚感作性試験への応用 (その 2 : *in vivo* 法との相関性)、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26 日、国立京都国際会館

② 竹澤俊明、福田真野、Mcintosh Ambroe Winnette, 高 知愛、Elisseff Jennifer H., 芳賀早苗、尾崎倫孝、加藤聖子、王 碧昭、内野 正、西田輝夫、コラーゲンビトリゲル薄膜の特徴を活用した新しい細胞培養システムの開発、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 27 日、国立京都国際会館

③ 武吉正博、小島 肇、大森 崇、寒水孝司、吉村 功、出原賢治、五十嵐良明、金澤由基子、青儀 巧、田中正志、有馬和範、湯浅敦子、牧 栄二、LLNA-BrdU 法の施設間バリデーション研究、日本実験動物代替法学会第 21 回大会、2008 年 11 月 13 日、埼玉会館

④ 五十嵐良明、三輪麻紀子、内野 正、徳永裕司、けい皮化合物の皮膚感作性強度の比較、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月 28 日、国立オリンピック記念青少年総合センター

⑤ 小島 肇、武吉正博、大森 崇、寒水孝司、有馬和範、出原賢治、金澤由基子、牧 栄二、中桐直人、五十嵐良明、田中正志、湯浅敦子、吉村 功、LLNA-BrdU 法の施設間バリデーション研究、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月 28 日、国立オリンピック記念青少年総合センター

⑥ 内野 正、竹澤俊明、五十嵐良明、徳永裕司、コラーゲンビトリゲル薄膜を用いた 3 次元培養ヒト皮膚モデルの *in vitro* 皮膚感作性試験への応用、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜

⑦ 五十嵐良明、山田真生、三輪麻紀子、内野 正、徳永裕司、皮膚感作性試験 LLNA-BrdU 法における SI 値の安定性、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜

⑧ Uchino, T., Takezawa, T., Ikarashi, Y., Tokunaga, H., Construction of three-dimensional human skin model consisting of dendritic cells, keratinocytes and fibroblasts on collagen vitrigel membrane, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 2007 年 8 月 24 日、東京

⑨ 五十嵐良明、山田真生、内野 正、徳永

裕司、非 RI-local lymph node assay における ELISA 条件の検討、第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会、2007 年 6 月 29 日、タワーホール船堀

⑩ 内野 正、樹状細胞を含む三次元培養ヒト皮膚モデルの構築とその皮膚感作性試験への応用、日本薬学会第 127 年会シンポジウム、2007 年 3 月 30 日、富山市民プラザ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内野 正 (UCHINO TADASHI)

国立医薬品食品衛生研究所・環境衛生化学部・主任研究官

研究者番号 : 40232863

(2) 研究分担者

竹澤 俊明 (TAKEZAWA TOSHIAKI)

独立行政法人農業生物資源研究所・遺伝子組換え家畜研究センター・主任研究員

研究者番号 : 50301297

五十嵐 良明 (IKARASHI YOSIAKI)

国立医薬品食品衛生研究所・環境衛生化学部・室長

研究者番号 : 60176071