

# 化学品の簡易安全性評価法

住友化学(株) 生物環境科学研究所  
太田 美佳  
中村 洋介  
北本 幸子  
森本 隆史

## Alternative methods for the safety evaluation of chemicals

Sumitomo Chemical Co., Ltd.  
Environmental Health Science Laboratory  
Mika Ota  
Yosuke NAKAMURA  
Sachiko KITAMOTO  
Takashi MORIMOTO

To evaluate the toxicity of chemicals, sometimes the alternative methods instead of prescribed methods are very useful. As the alternative methods have their own sensitivity to distinguish chemical toxicity, we have to consider the detection principle and the sensitivity of the methods before use. Many alternative methods are developing now. It is desirable that the detection sensitivity and the results consistency between the alternative and the prescribed methods will be increased by the improvement of the methods and/or the ingenious way of using. In this review, we describe the public situation, trend, and our examination of the alternative methods to detect genotoxic, skin irritating or skin sensitizing potential of chemicals.

### はじめに

化学品の安全性を評価する試験は様々であるが、化学品を工場等で取り扱う上で、あるいは開発候補品の初期選別において把握しておくべき最小限の毒性は、遺伝毒性、急性毒性、眼・皮膚刺激性、皮膚感作性である。これらを把握することにより、その化学品の基本的な取り扱い方法を決定することができる。

遺伝毒性のスクリーニング試験として最もよく使用されている試験はAmes試験とも呼ばれる細菌を用いる復帰突然変異試験である。Ames試験は毒性試験の中では簡便かつ安価な試験ではあるが、化合物の開発初期においてはさらに少ない化合物量で、より短期間に結果が判明し、多量の検体の処理を行うことができる試験が望まれている。

急性毒性、眼・皮膚刺激性および皮膚感作性については、ガイドライン試験としては動物を用いる試験が必須であるが、動物を用いる試験では、時間、費用がかかり、さらに動物愛護の面からも代替法が望まれている。

本稿では簡易安全性評価法について、当社で検討および実施している試験（遺伝毒性試験についてはumu試験、皮膚刺激性試験については皮膚三次元モデル試験、皮膚感作性試験についてはLLNA（Local Lymph Node Assay）および結合物測定）を中心に、代替法の現状と課題について紹介する。

### 遺伝毒性（umu試験）

#### 1. 規制動向および現行試験方法

遺伝毒性とは遺伝物質であるDNAに対して傷害を及ぼす化学物質の作用である。直接または間接的に受けたDNAの傷が元通りに修復されないと、遺伝子の突然変異や染色体の異常を生じるが、これらは細胞癌化の引き金の一つとなっている。したがって、遺伝毒性を有する物質は発癌物質である可能性が高い。さらに、遺伝子の突然変異や染色体の異常を生じる物質は、次世代に対して遺伝性疾患を引き起こす可能性もある。動物を用いて発癌性や次世代への影響の有無を調べる試験は多額の費用と時間を要するため、次々に開発される全ての化学品について、

発癌性や次世代への影響を調べる試験を行うことは困難である。そのため、発癌性や遺伝的障害作用の有無が判っていない化学品を取り扱う場合、遺伝毒性は初期において評価しておくべき毒性の一つに挙げられる。

種々の機構で引き起こされる遺伝的な障害を検出するため、これまでに複数の *in vitro* あるいは *in vivo* の遺伝毒性試験が開発されてきた (Table 1)。

**Table 1** A List of Mutagenicity Tests

| Materials       | Categories of Mutagenicity Tests                      |  |                                  |
|-----------------|---|--|----------------------------------|
|                 | Gene Mutation   | Chromosomal Aberration   | DNA Damage & Repair              |
| Bacteria        | •Ames Test<br>•HGPRT Gene                             | *****<br>•Chromosomal  | •Rec-Assay                       |
| Mammalian Cells | Mutation Test<br>•Mouse Lymphoma Assay                | Aberration Test<br>•Sister Chromatid Exchange Assay                                    | •Unscheduled DNA Synthesis Assay |
| Animals         | •Spot Test<br>•Gene Mutation Assay in Transgenic Mice | •Micronucleus Test<br>•Chromosomal Aberration Test<br>•Sister Chromatid Exchange Assay | •Unscheduled DNA Synthesis Assay |

通常これら試験のいくつかを組み合わせることで、ほとんどの遺伝毒性物質が検出できることがわかっている。このため、国内外の農業・医薬品の試験ガイドラインでは、少なくともAmes試験、哺乳動物細胞を用いる染色体異常試験およびげっ歯類を用いた小核試験の3試験の総合評価が登録取得上必須である。一方、数の上ではるかに多い一般化学物質においては、「化学物質の審査および製造等の規制に関する法律（化審法）」ではAmes試験および哺乳動物細胞を用いる染色体異常試験が、「労働安全衛生法（安衛法）」ではAmes試験が、それぞれ登録取得において最小限必要な遺伝毒性試験となっている。中でもAmes試験は、遺伝毒性の中で最も基本である突然変異生成のポテンシャルを調べる試験であること、細菌を用いるものの突然変異生成のメカニズムは基本的に高等生物にも共通すること、試験法が比較的簡便で、短期間にかつ安価に結果が得られることなどから、特に重要な試験として位置づけられる。

Ames試験は、Amesら<sup>1)</sup>によって開発された、生育に必須なアミノ酸（ヒスチジン）が合成できないネズミチフス菌を用いる。被験物質で処理した菌を、ヒスチジンを含まない培地で生育させ、ヒスチジン合成遺伝子に突然変異が起こり、ヒスチジンを合成できるようになった突然変異体（コロニー）の出現を調べて遺伝毒性を検出する方法である。

当社においても医薬・農業の初期評価のみならず、

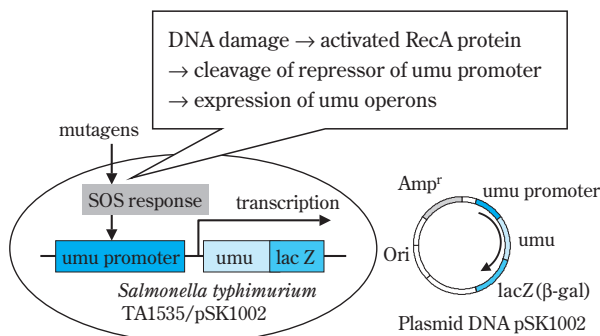
一般化学物質のレスポンスブルケアや製造現場における労働者安全の確保等のため、Ames試験による化学品のスクリーニング試験を行っている。近年開発スピードが急速に加速する中、Ames試験の実施件数は右肩上がりに増加してきている。

しかし、Ames試験はマンパワーに頼る手技が多く、1日1人あたり1~2化合物しか実施できないこと、比較的簡便かつ短期間といえども、100~200 mgの検体量が必要であり、試験期間もコロニーを形成させるために3日間を要することなどから、Ames試験よりもさらに早く、少量の被験物質で試験が実施でき、一度に多数の検体を試験できる新しいスクリーニング方法が求められている。

## 2. umu試験の利用と今後の課題

umu試験は1985年に小田らによって開発された試験である<sup>2)</sup>。Ames試験がヒスチジン合成遺伝子の突然変異をその表現型である突然変異コロニーを形成させて検出する試験であるのに対し、umu試験は細菌が本来持っているSOS応答という性質を利用し、DNAに生じた傷を感知して直ちに誘導される修復酵素の一つ、umu遺伝子産物の発現量を測定することで検出する試験である。プロモーターを含むumu遺伝子の下流にβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を連結させたプラスミドDNAを、Ames試験にも用いられるネズミチフス菌TA1535株に導入した菌株に遺伝毒性物質を作用させ、SOS応答により生成したβ-ガラクトシダーゼ活性を基質の呈色反応で検出する (Fig. 1)。umu試験は以前から知られた遺伝毒性の検出法の一つであったが、酵素活性を評価の指標とするためデータが単純で解析しやすいこと、マイクロプレートが使用可能<sup>3)</sup>なため検体量も少量で試験でき、低コストで自動化も可能なことなどから、近年のスクリーニング手法高速化の時流によって、umu試験が見直されてきている。

umu試験は、Ames試験と比較した場合、1試験にかかる工数が3日人から0.7日人、実験期間は3日間から6



**Fig. 1** Principle of umu test

～7時間に短縮でき、必要な検体量が100～200 mgから約10 mgに削減することが可能となる (Table 2)。

**Table 2** Comparison between umu test and Ames test

|                   | umu test          | Ames test       |
|-------------------|-------------------|-----------------|
| Workload          | 0.7 persons · day | 3 persons · day |
| Duration          | 6 ~ 7 hours       | 3 days          |
| Sample scale      | 10 mg             | 100 ~ 200 mg    |
| Cost performance  | low               | high            |
| Sensitivity       | low               | high            |
| Handling capacity | large             | small           |
| Automation        | highly suitable   | possible        |
| Registrability    | no                | yes             |

Ames 試験の代替として umu 試験を利用するには Ames 試験との良好な結果相関性が求められるが、これまでに調べられた260物質のうちAmes結果との一致率は90% (233/260)、Ames陰性をumu陽性として検出してしまった偽陽性率は3% (3/87)、Ames陽性の173物質に注目すると86% (149/173) はumu陽性として検出可能であった<sup>4)</sup>。

当社でもAmes試験の代替スクリーニング法という観点から、umu試験の評価を行ってきた。Table 3に当社が実施したumu試験とAmes試験の結果相関性をまとめた。

**Table 3** Relativity of umu test and Ames test

Total 270 samples  
(Pesticides : 59 Medicine : 159 Industrial chemicals : 52)

| Ames     | umu      |          | Total |
|----------|----------|----------|-------|
|          | positive | negative |       |
| positive | 28       | 46       | 74    |
| negative | 2        | 194      | 196   |
| total    | 30       | 240      | 270   |

Concordance 82%

Occurrence of false umu positive 1%

Ames positive predictability 38%

当社の化合物ライブラリー270物質におけるAmes試験との一致率は82% (222/270) と、文献値と同程度の相関性を示した。また、umu偽陽性の結果も稀 (1%, 2/196) であることが確認された。一方、Ames陽性の74物質に注目すると、このうちumu陽性と検出できたものは38% (28/74) で、残りの46化合物 (62%) は期待に反してumu試験で陽性と検出できなかった。

以上のとおり、当社の化合物ライブラリーでumu試験を評価した結果、現時点でumu試験をAmes試験

と置き換えてスクリーニング試験として実施するには、Ames試験陽性化合物の検出率が不十分な結果であった。Ames試験陽性化合物をその陽性の強さで分類して考察してみると、比較的強い陽性を示す化合物はumu試験でも検出可能であるが、弱い陽性を示す化合物の検出感度が低い傾向を示した。したがって、強い遺伝毒性を示すリード化合物 (母核) の除外、あるいは開発候補化合物が多数ある極めて早い段階 (少量の検体) での強い遺伝毒性を示す候補化合物の除外等、umu試験の特徴を上手く利用することによって、必要性に応じて、効率良いスクリーニング手法としてumu試験を用いることができると考える。今後の課題として、umu試験を幅広く適用していくためには、Ames陽性化合物の検出率を上げるような試験系の改良が必要と考える。

### 皮膚刺激 (腐食) 性 (皮膚3次元モデル試験)

#### 1. 規制動向および現行試験方法

刺激性とは、眼あるいは皮膚に化学品が曝露することによって起こる炎症反応であり、皮膚では表皮、真皮細胞の壊死あるいは炎症性サイトカインの発現による紅斑、腫脹が、眼では角膜表面の変化に伴う角膜混濁や結膜での発赤、浮腫などが発現する。また、稀に真皮にまで至る皮膚炎症や眼の強い角膜混濁が認められ、これらの症状は回復しないこともあり、不可逆的な反応として「腐食性」と判定される。

農薬 (適用経路により医薬品についても) では、眼・皮膚刺激性試験は申請上必須であり、OECD、EPA、EU、農水省ガイドラインは、ウサギを用いた試験を推奨している。また、強塩基 (pH 11.5) もしくは強酸 (pH 2) の化学品や構造活性相関により腐食性物質と判断される場合は試験不要であり、さらに皮膚で腐食性が認められた場合は眼刺激性試験を実施しないとといった段階的な試験スキームが提案されている。このような段階的なスキームの提案背景には、刺激性試験は動物に与える苦痛が大きいと考えられ、欧州を中心とした動物数の削減や苦痛の低減といった動物愛護の考えがあるものと思われる。

刺激性試験代替法の開発は1980年代から進められており、皮膚腐食性では、ヒト三次元皮膚モデル試験のバリデーション試験が1996年から2000年にかけてECVAM (European Center for the validation of Alternative Methods) を中心に欧州で行われた<sup>5), 6)</sup>。さらに試験プロトコルの改良やcatch-upバリデーション試験を経て、皮膚腐食性試験の初期評価 (スクリーニング) 試験である *in vitro* 皮膚腐食性試験として2004年にOECDガイドラインに採択された<sup>7)</sup>。また、

米国でも2002年にICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) によって同様の評価が行われている。

一方、眼・皮膚刺激性は、国内の化審法および安衛法の対象ではなく、製造に従事している作業者が曝露する可能性のある製造中間体等の刺激性評価については、各企業が自主的に管理する必要がある。現在、当社では、製品のみならず、製造中間体についても作業者の安全確保を目的として眼・皮膚刺激性データを取得しており、その試験数は年間100件を超えている。これら試験を代替化することは、動物愛護のみならず、試験データの早期取得やコスト削減の観点からも重要であると考え、皮膚腐食性のスクリーニング試験である *in vitro* 皮膚腐食性試験として、ヒト皮膚三次元モデル試験の導入、検討をまず実施した。

## 2. ヒト皮膚三次元モデル試験 (皮膚腐食性スクリーニング試験)

ヒト三次元皮膚モデルの概略をFig. 2に示した。

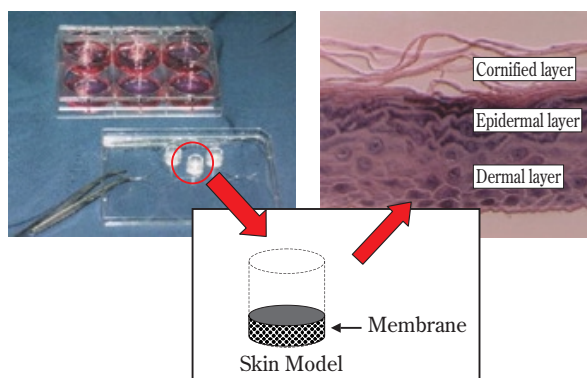


Fig. 2 Human skin 3D-model (EpiDerm™)

モデルは、ヒト皮膚同様に基底層、顆粒層、角質化層の三次元構造から成っている三次元細胞培養系である。本モデルは代謝能力も有しており、皮膚で起こる生体反応をより精確に再現できる試験法と考えられる。本モデルに対して被験物質を曝露後、その細胞生存率を指標に皮膚腐食性を評価する<sup>8)</sup>。試験方法の概略をTable 4に示した。現在、ヒト皮膚三次元モデルとしてEpiDerm™、EPISKIN™などが市販されている。

ヒト皮膚三次元モデル試験 (皮膚腐食性スクリーニング試験) については、国内でも2004年に12化合物を用いた小規模の多施設間バリデーション試験が行われ、当社も参加した。国内バリデーション結果については別途発表される予定である。また、当社独自の検討として、当社化合物のヒト皮膚三次元モデル試験を実施した。当社化合物においても、例数

Table 4 Human skin 3D-model (EPISKIN™, EpiDerm™) Test Methods (ICCVAM summary report)

|                                | EPISKIN™  | EpiDerm™ (EPI-200)  |
|--------------------------------|---|---|
| Dosing procedures              | Liquids : 50 $\mu$ L applied neat<br>Solids : 20 mg + saline        | Liquids : 50 $\mu$ L applied neat<br>Solids : 25 mg + 50 $\mu$ L H <sub>2</sub> O   |
| Exposure                       | 3 minutes, 1 hour, 4 hours  | 3 minutes, 1 hour   |
| Endpoint                       | Relative cell viability compared to concurrent negative control     |   |
| Negative and positive controls | Negative control : saline<br>Positive control : glacial acetic acid | Negative control : water<br>Positive control : 8.0 N KOH                            |
| Positive criteria              | Relative cell viability :<br>< 30% at any exposure duration         | Relative cell viability :<br>< 50% after 3 minutes, and/or<br>< 15% after 60 minute |

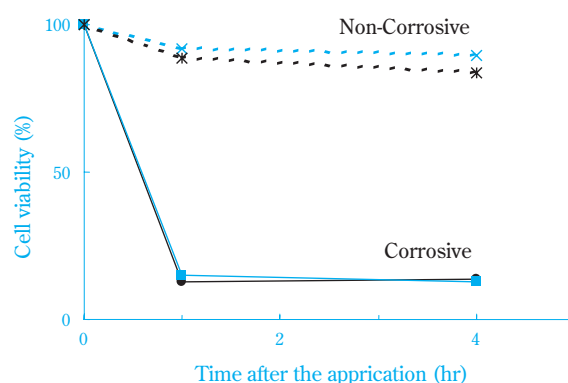


Fig. 3 Result of Human skin 3D-model Test

は少ないながら、腐食性有りと腐食性無しの化合物を分類することができた (Fig. 3)。

## 3. 今後の課題

動物試験から *in vitro* 試験への代替化は、動物愛護だけでなく、試験データの早期取得、コスト削減をはかることができ、当社においてもその研究は急務である。

上述したヒト皮膚三次元モデルは、現在は皮膚腐食性のスクリーニング試験としてのみバリデーションが行われているが、ヒトの皮膚構造、代謝能力を有する点や被験物質の溶解性や性状を問題としない点から、皮膚刺激性代替法試験としても最も有望であると考えられる。皮膚刺激性試験にヒト皮膚三次元モデルを導入すると、試験期間は動物試験の14日間から2日間へと大幅に短縮することができる。コスト面では、試験に使用するモデルカップが高価なため、大幅な改善には至らないが、ガイドラインで認められたモデルカップと同じ形態や機能を持ち、より安価な製品が開発されてきており、これら製品の信頼性が示され、置き換えが可能となることでより安価に実施できるようになるとと思われる。

一方で、ヒト皮膚三次元モデルは、現時点で *in vivo* で腐食性を示す物質は評価できるものの、難水性の検体あるいは刺激の弱い化合物を評価するまでには至っていない。現在、ECVAM や ICCVAM では、EC<sub>50</sub>（細胞生存率が50%となる化合物濃度）やET<sub>50</sub>（細胞生存率が50%となる化合物曝露時間）と刺激性との相関を見ているが基準作成には至っていない。

さらに、ごく稀ではあるが、ウサギでは腐食性を示すものの、皮膚モデルでは腐食性が検出されない場合がある。この原因として炎症性サイトカインの影響があると考えられ、細胞生存率ではなくサイトカインの分泌<sup>9)</sup> や遺伝子発現<sup>10)</sup> の変動などをエンドポイントとした検討も進められている。

眼刺激性の代替法では、家畜や家禽などの摘出眼を用いた試験や、皮膚刺激性の三次元モデルと同様にヒト線維芽細胞を使用してヒト角膜と類似構造を持つキット (EpiOcular™) が開発され、検討されている<sup>11)</sup>。摘出眼を用いた試験 (Isolated Rabbit Eye Test, Isolated Chicken Eye Test, Bovine Corneal Opacity and Permeability Test, Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane Test) については、NICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) および ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) での評価が行われ、いずれも腐食性と強い眼刺激物質を判別する tier 法への使用は (一部条件付で) 可能と評価している。EpiOcular™ については動物試験との相関や信頼性など十分な評価はなされていない。

当社においても、今後の世界的な動向に着目しながらヒト皮膚三次元モデルを使用した皮膚刺激性代替法確立に向けて、さらなる検討を実施していくつもりである。また、眼刺激性代替法についても、最も有望な試験法の導入を中心に *in vitro* 試験への代替化を推進していくつもりである。

## 皮膚感受性 (LLNA および 結合物測定)

### 1. 規制動向および現行試験方法

皮膚感受性は化学品に繰り返し曝露することで皮膚に発疹 (かぶれ) を引き起こすアレルギー反応である。従来の研究から、皮膚感受性の発症には「感作」と「誘発」という2つのステップがあることが知られており、「感作」のステップでは化学品が皮膚に接触することで生体内に浸透した後、生体内の蛋白質と反応し、抗原となり、抗原提示細胞 (Langerhans細胞) 上に提示されることで、この抗原を認識したTリンパ球が増殖する。続いて、「誘発」のステップでは、「感作」のステップと同様、化学品が皮膚

内に浸透し、抗原となるが、既に増殖したTリンパ球が皮膚に存在するため、皮膚で反応を起こすことで、様々なサイトカインが放出され、紅斑および浮腫などの発症を引き起こす<sup>12), 13)</sup> (Fig. 4)。

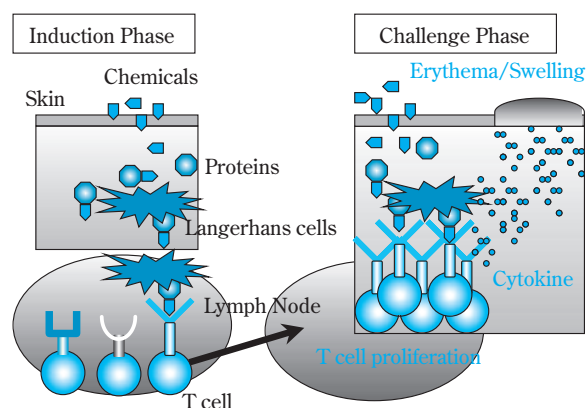
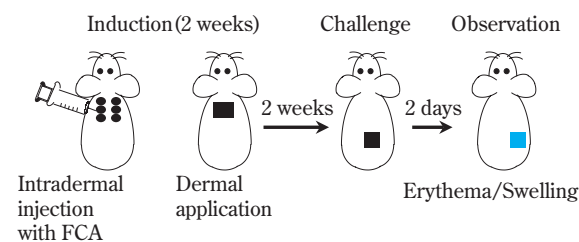


Fig. 4 Mechanism of skin sensitization

このような皮膚感受性の機序に基づいた試験系が今までに検討されており、現在、様々な化学品の登録申請に広く認められている試験方法の一つにモルモットを用いた Maximization Test (GPMT) がある<sup>14)</sup>。GPMTは「感作」と「誘発」という2つのステップを試験系に含み、「感作」処置の段階で免疫増強剤を併用することで検出感度を良くした試験方法である (Fig. 5)。当社でも農水省、薬事法申請、EPAおよびEU申請時には主にGPMTを用いて評価している。

### Test property

- ① Confirmation of skin reaction (erythema / swelling)
- ② High sensitivity
- ③ Long test period (4 weeks)



- Reaction Score (0-6) : Score  $\geq 1$   $\rightarrow$  positive
- Sensitizing ratio = positive / total number of animals

Fig. 5 Guinea Pig Maximization Test (GPMT)

これに対して、製造中間体については不安定なものが多く皮膚感受性の強いものが含まれる場合もあるが、製造中間体などについては、化審法、労安法の対象ではないため、各企業が自己管理する必要がある。当社では、社内作業者の安全性を確保するた

めに、これら製造中間体を取り扱う前に、その感作性ポテンシャルを把握することが必要であると考えている。GPMTでは試験期間が約1ヶ月を要し、製造中間体は非常に多いため、社内作業者の安全性を確保する上でタイムリーなデータを得るという点では問題が残っている。

## 2. Local Lymph Node Assay (LLNA)

LLNAは欧州を中心として苦痛削減、使用動物数削減などの動物愛護の観点から代替法として開発された試験系であり<sup>15)~17)</sup>、GPMTが「感作」「誘発」のステップを試験系とするのに対し、LLNAは「感作」のステップで評価しようというものであり、試験期間も約1週間程度で得られるというメリットがある試験系である (Fig. 6)。

### Test property

- ① Detection of lymphocyte cell proliferation
- ② Low sensitivity (compare with GPMT)
- ③ Short test period (1 week)

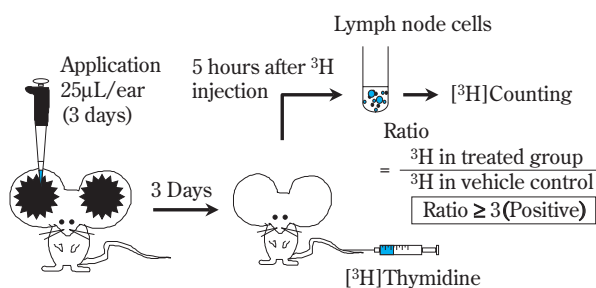


Fig. 6 Local Lymph Node Assay (LLNA)

Table 5にLLNAとGPMTの試験系のメリットおよびデメリットをまとめた。

Table 5 Comparison of LLNA and GPMT

|                     | LLNA   | GPMT    |
|---------------------|--------|---------|
| Duration            | 1 week | 4 weeks |
| Cost performance    | Low    | High    |
| Sample scale        | 1g     | 20g     |
| Sensitivity         | Low    | High    |
| Cross-reaction Test | No     | Yes     |
| Registrability      | Yes    | Yes     |

LLNAはGPMTと比較して、弱い感作性物質は検出できないことやRI標識化合物を用いるため操作が若干煩雑になるなどのデメリットはあるものの、ヒトでかぶれを起こすような強い感作性物質は検出できること、陽性となる濃度を比較することで化合物間の皮膚感作性の強さを比較できること、さらに動物

に係るコスト削減や試験期間の短縮などの大きなメリットがある。また、最近ではEC (2004) やOECD (2002)<sup>18)</sup>のガイドラインに試験方法が認められているため、今後、皮膚感作性試験の中心となる試験系と思われる。

当社では1998年からLLNAを導入し、化学品の皮膚感作性評価を行ってきた。その結果、早期に、社内作業者の安全性を確保することができ、また、EC3の値を基に感作性ポテンシャルを把握することで、適切な設備あるいは保護具の推奨を行っている。

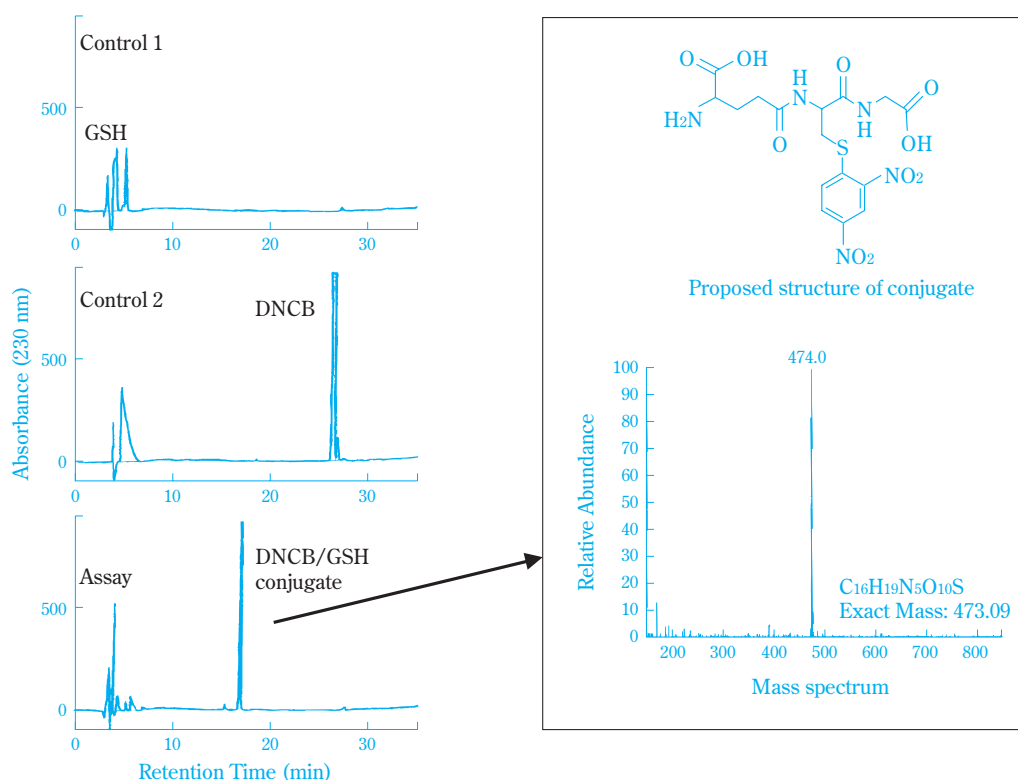
しかし、ヒトでかぶれを起こす物質の中には、LLNAでは検出できないが、GPMTでは検出できるような化学品もあること<sup>16)</sup>、LLNAの曝露経路が経皮的であるため、皮膚への保持時間の短い水溶性の化合物の検出能力が低い点<sup>18)</sup>などが課題であり、今後、これら化学品を検出できるような媒体の選択を含めた試験系の改良が必要となると思われる。

## 3. *in vitro*試験方法 (結合物測定) の取り組みと *in vivo*との相関

LLNAは代替法 (refinement/reduction) として認められているものの、動物を使用するため、完全な代替法 (replacement) ではない。また、2009年からEU国内では動物試験を実施した化粧品およびその原料について販売が禁止されるなど、動物を用いない皮膚感作性試験が望まれている。また、当社でも、最近では社内で取り扱う原料、製造中間体について早期に感作性データを取得することになっているが、製品の開発スピードが速くなっているのに対して、LLNAは試験期間が1週間程度かかることから、必要な全ての化学品についてのデータを取得するには多くの時間がかかるという問題を抱えている。このため、さらに試験期間を短縮した皮膚感作性スクリーニング法が当社でも望まれている。

化学品が皮膚感作性を起こすためには、上述のとおり、まず、皮膚を透過すること、続いて生体内蛋白質と反応 (共有結合) することが第一ステップとなっている。従来の研究ではこの第一ステップに着目し、類似化学品を用いてその反応性を解析することや、皮膚透過性の指標としてlogPあるいはlogKo/wを算出することで皮膚感作性を類推する試みがなされてきた<sup>19)~21)</sup>。このような中で当社では特に化学品の生体内蛋白質との反応性に着目し、その検出手法としてLC massを用いた1日で評価できる方法を有機合成研究所とともに開発した<sup>22)</sup>。

一般的に、感作性物質は蛋白質を構成するアミノ酸残基 (特にシステインやリジンなど) と反応することが知られている。このため、化学品の蛋白質への反応性に着目した試験系として、化学品とグルタ



**Fig. 7** Analysis of the formation of conjugates (LC-MS)

チオン（グルタミン酸、システイン、グリシンから成るトリペプチド）を一定条件で混合し、混合後の反応液をLC massにより解析することで、結合物の有無を解析し、感作性の評価をするものである。

Fig. 7に示すように、感作性物質として知られている2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB) をグルタチオンと混合し、その反応液をLC massで分析すると、DNCBおよびグルタチオンが結合したと考えられるピークが検出される。このように、既に皮膚感作性陽性あるいは陰性であることが判明している化学品（陽性61件、陰性21件）82検体についてグルタチオンとの反応性を解析した結果をTable 6に示した。

GPMTあるいはLLNAなどの*in vivo*試験で陽性となった61検体の内、結合物試験で陽性となった化学品は30検体（49%）、陰性となった化学品は31検体（51%）、*in vivo*試験で陰性となった21検体の内、結

**Table 6** Relativity of *in vitro* (peptide-binding assay) and *in vivo* test

|                          | <i>in vivo</i><br>Positive | <i>in vivo</i><br>Negative | total |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------|-------|
| <i>in vitro</i> Positive | 30                         | 2                          | 32    |
| <i>in vitro</i> Negative | 31                         | 19                         | 50    |
| total                    | 61                         | 21                         | 82    |

Concordance = 60%

*in vivo* Positive Predictability = 94%

合物試験が陽性となった化学品は2検体（10%）、陰性となった化学品は19検体（90%）であった。このため、一致率は60%（49/82）となったが、結合物試験で陽性となった化合物の皮膚感作性陽性予測性は94%（30/32）となることが判明した。

#### 4. 皮膚感作性代替法の有用性と今後の課題

今までの検討から、当社では皮膚感作性の早期データ取得のスキームとして、文献、既存化学品の試験結果および結合物測定 (*in vitro*) を用いた1次評価を行い、製品の重要度や規制に応じて、LLNAあるいはGPMTを用いた試験を効率よく行っている。しかし、今後、① 定量性、② 予測性といった大きな課題も残っている。

GPMTおよびLLNAは化学品の皮膚感作性ポテンシャルを発症する濃度などで定量的に表すことができ、当社の作業も取り扱う製造中間体がどの程度のポテンシャルを持つかを比較することができ、それに合わせた保護具などを選択できる。しかし、結合物測定は現状、定性的な結果を得るに過ぎない。これに対して、当社のように化学品の反応性に着目した研究はGerberick (P&G) らのグループでも行われており、彼らは化学品の反応性を、残存-SH基を測定することで定量的に表し、皮膚感作性ポテンシャルの比較を行おうとしている。このため、今後、結合物生成時間や濃度などを指標とした反応性に関する定量

的な比較手法を確立することが望ましいと思われる。

また、予測性の面では、上述のように偽陽性が僅かに認められることや、偽陰性の検体数が多いことが課題となっている。当社で偽陽性となった2件についてはGerberickらの検討でも偽陽性となっており、その原因を皮膚透過性としている。このように、*in vitro*の系で反応性を示す幾つかの化合物の中には実際の皮膚では透過しにくい、あるいは透過し、反応しても認識されないなどの他の原因によって皮膚感作性が起きていない可能性や、陰性となっている*in vivo*試験系が適切であったかなど、今後、さらなる解析が必要と思われる。一方、偽陰性となる化合物群の多くは生体内で代謝を受けて感作性を示す可能性が高いものが多く、今後は代謝を加味した試験系の改良が必要であると思われる。

このような改良を更に加えることで、より精度の高い皮膚感作性スクリーニング法を確立し、早期に化学品の皮膚感作性のポテンシャルを評価し、作業者への注意喚起を行うことで、作業者の更なる安全を確保していきたい。

## おわりに

以上述べたとおり、簡易安全性評価法にはそれぞれの特徴がある。簡易安全性評価法は毒性発現機構の一部のエンドポイントのみに限定した検出法であり、特定の反応が起こるかどうかを指標とした検出系であると言える。このため、簡易評価法では、毒性を正確に把握できる化合物もあればできない化合物も当然存在する。

それにもかかわらず簡易安全性評価法には、短期で結果が判明する、化合物の使用量が少なく済む、多量の検体を一度に処理できる、安価である等の長所が多々ある。今後の化学品の安全性評価を考える上で、これら簡易安全性評価法の特徴を正確に把握し、それらを踏まえた上での使い方を考える必要がある。つまり、毒性を把握するためのtier法（段階的に試験を実施するステップ法）の一つとして採用することが重要と考える。例をあげれば、多数のスクリーニング候補化合物から少なくともumu試験が陽性となる化合物をふるい落とす（後に行うAmes試験で陽性となる確率が高い）あるいは多数の化合物について動物実験をタイムリーに行う時間が無いときには結合物陽性となる化合物は感作性のある物質として扱うなどである。特性を理解して上手く簡易評価法を使用すれば、それは時間やコストの短縮につながり、非常に有益であると考えられる。

ここに述べたこれら簡易安全性評価法はまだ発展途上のものが多く、問題点をできる限り改善し、最

善の評価法を作り上げるために、今後とも更なる改良を行い、また使い方の工夫を実施していきたいと考える。

## 引用文献

- 1) D.M. Maron and B.N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) Y. Oda, S. Nakamura, I. Oki, T. Kato and H. Shinagawa, *Mutat. Res.*, **147**, 219 (1985).
- 3) G. Reifferscheid, J. Heil, Y. Oda and R.K. Zahn, *Mutat. Res.*, **253**, 215 (1991).
- 4) G. Reifferscheid and J. Heil, *Mutat Res.*, **369**, 129 (1996).
- 5) P. Portes, M. H. Grandidier, C. Cohen and R. Roguet, *Toxicology in Vitro*, **16**, 765 (2002).
- 6) J. H. Fentem, and P. A. Botham, *ALTA*, **32**(1), 683 (2004).
- 7) OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), *OECD guide line for Testing chemicals 431 :in vitro skin corrosion: Human skin model Test*, 2004
- 8) Summary Report of the EpiDerm (EPI-200) In Vitro Assay for Assessing Dermal Corrosivity, 1, [iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/cwgfina/08b\\_summ.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/cwgfina/08b_summ.pdf)
- 9) M. A. Perkins, R. Osborne, F. R. Rana, A. Ghassemi and M. K. Robinson, *Toxicological Science*, **48**, 218 (1999).
- 10) S. T. Fletcher, V. A. Baker, J. H. Fentem, D. A. Basketter and D. P. Kelsell, *Toxicology in vitro*, **15**, 393 (2001).
- 11) M. Stern, M. Klausner, R. Alvarado, K. Renskers and M. Dickens, *Toxicology in Vitro*, **12**, 455 (1998).
- 12) R. J. Scheper and B. M. E. Blomberg, *Textbook of Contact Dermatitis*, **1992**, 11.
- 13) F. M. Marzulli and H. I. Maibach, *Dermatotoxicology*, **1996**, 143.
- 14) B. Magnusson and A. M. Kligman, *The Journal of Investigative Dermatology*, **52**(3), 268(1969).
- 15) I. Kimber and D. A. Basketter, *Food and Chemical Toxicology*, **30**, 165 (1992).
- 16) I. Kimber, R. J. Dearman, E. W. Scholes and D. A. Basketter, *Toxicology*, **93**, 13 (1994).
- 17) I. Kimber, J. Hilton, R. J. Dearman, G. F. Gerberick, C. A. Ryan, D. A. Basketter, L. Lea, R. V. House, G. S. Ladies, S. E. Loveless and K. L. Hastings, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **53**, 563 (1998).



- 18) OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), *OECD guideline for testing chemicals 426: Skin Sensitization*, 2002.
- 19) M. D. Barratt, D. A. Basketter, M. Chamberlain, G. D. Admans and J. J. Langowski, *Toxicol. In Vitro*, **8**, 1053 (1994).
- 20) C. Graham, R. Gealy, O. T. Macina, M. H. Karol and H. S. Rosenkrantz, *Quant. Struct. Act. Relat.*, **15**, 224 (1996).
- 21) T. Ashikaga, A. Motoyaman, H. Ichikawa, H. Itagaki and Y. Sato, *Altern. Animal Test Experiment*, **7**, 30 (2000).
- 22) H. Kato, M. Okamoto, K. Yamashita, Y. Nakamura, Y. Fukumori, K. Nakai and H. Kaneko, *The Journal of Toxicological Sciences*, **28**(1), 19 (2002).

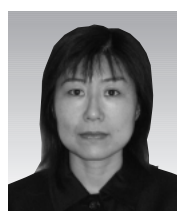
PROFILE



太田 美佳

Mika Ota

住友化学株式会社  
生物環境科学研究所  
主席研究員



北本 幸子

Sachiko Kitamoto

住友化学株式会社  
生物環境科学研究所  
主任研究員



中村 洋介

Yosuke Nakamura

住友化学株式会社  
生物環境科学研究所  
主任研究員 理学博士



森本 隆史

Takashi Morimoto

住友化学株式会社  
生物環境科学研究所  
研究員