

ヨーロッパにおける消費者製品の感作性物質の規制
、動物実験代替法のin
vitro試験及びQSARソフトのEU最新情報

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2011-04-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 亀尾, 聡美, 皆本, 景子, 佐藤, 一博 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/3174

平成22年度厚生労働科学研究費補助金（労働安全衛生総合研究事業）
分担研究報告4

ヨーロッパにおける消費者製品の感作性物質の規制、動物実験代替法の
in vitro 試験、及び、QSAR ソフトの EU 最新情報

分担研究者 亀尾聡美（群馬大学大学院医学系研究科・公衆衛生学）
分担研究者 皆本景子（熊本大学大学院生命科学研究部・環境保健医学）
分担研究者 佐藤一博（福井大学医学部環境保健学）

研究要旨

オランダ・国立公衆衛生環境研究所（RIVM）の Henk van Loveren 教授および RIVM 研究員を訪問し、消費者製品における感作性物質の規制、感作性物質の動物実験代替法の in vitro 試験、及び、QSAR ソフトの EU 最新情報などについて調査し討論を行った。EU において消費者製品中の物質の法的規制により感作性物質由来の接触皮膚炎の減少など顕著な効果が得られていた。今後、EU での RREACH 規制等により動物実験が困難となっていくなか、皮膚感作性試験について、QSAR などの動物実験代替法の開発が重要となると考えられた。今回の訪問を通じて、日本における感作性物質リスト作成を今後進める上での有益な議論・交流を行うことができた。

A. 研究目的

日本における感作性物質リスト作成を今後進める上での参考とするために、オランダ・国立公衆衛生環境研究所（RIVM）を訪問し、ヨーロッパ共同体（EU）における消費者製品中の感作性物質の規制、動物実験代替法の in vitro 試験および QSAR ソフトの最新情報などについて調査し、議論・交流を深めることを目的とした。

B. 研究方法

平成22年8月21日～29日のドイツ・オランダ訪問の期間中、25日～27日にかけてオランダ・ビルトーベンのオランダ・国立公衆衛生環境研究所（RIVM）を訪問し、Henk van Loveren 教授および、研究所の研究員の講演に出席し、ヨーロッパにおける感作性物質を初めとする化学物質

の規制、消費者製品中の感作性物質の規制、動物実験代替法の最新情報についての調査・討論を行った。

C. 研究結果

1. 消費者製品における感作性物質

オランダ RIVM では、EU における消費者製品の感作性物質に関して様々な調査・研究を行っている¹⁾。その内容の一部について紹介する。消費者製品としてジュエリー、化粧品、衣服、革製品などが挙げられる。一般消費生活のみではなく職業曝露の可能性もある。EU の欧州化学品庁（ECB）における法的規制としては、R42：気道感作性では、主にヒトに対しての研究結果を基にしており職業性喘息も含まれている（26物質）。R43：皮膚感作性では、ヒトに対しての研究結果と適切な動物試験の結果を基にしてい

る (643 物質)。R42 と R43 の両方に該当するのは 51 物質である。ジュエリーにおけるニッケルなどの金属、衣服や洗剤その他の消費者製品に含まれるクロム、重クロム酸カリウム、コバルトなどが皮膚感作性について重要である。様々な消費者製品の中に防腐剤として含有されることのある isothiazolinones, Methyl dibromoglutaronitrile (MDBGN), Formaldehyde, Thiurames, Di-isocyanates, Parabens などが注目されている。また香水・エアフレッシャーなどに使われる D-limonene, Tree moss, Oak moss, Peru balsam などが、皮膚感作性があるとされている。P-Phenylenediamine (PPD) に代表される Hair dyes (毛染め剤) の皮膚感作性も問題となっている。ヨーロッパの一般の人々約 26,000 人の疫学調査から得られた消費者製品中のアレルゲンの皮膚感作性の陽性率は、ニッケル (17.9%)、フレグランスミックス (9.7%)、Peru balsam (6.0%)、コバルト (5.9%)、重クロム酸カリウム (4.6%)、thiurams (3.2%)、及び PPD (3.9%) である¹⁾。

2. 消費者製品中の感作性物質規制の効果

デンマークにおける法的規制による効果の例について紹介する。1990 年に消費者製品からのニッケル溶出を法的規制により $0.5 \mu\text{gNi}/\text{cm}^2/\text{week}$ 以下に減少させた。デンマークの皮膚疾患を持つ若い女性患者 (5-30 歳) におけるニッケルアレルギーの陽性率は、27.6% (1985 年) から 16.8% (2007 年) へ減少した²⁻³⁾。ヨーロッパ全体においては 1994 年にニッケルの規制が行われ、その後ニッケル由来の接触皮膚炎は減少した。これは、ニッケル規制の効果によるものと考えられた。しかしながら、

ニッケルは、EU 諸国において高頻度でパッチテスト陽性となるアレルゲンであり、コバルトなどの他の金属とともに今後も調査研究の継続が必要であると考えられる。また、セメント中のクロム含有量を 1983 年に 2ppm 以下とした結果、陽性率は、8.9% から 1.3% に減少した。このように EU において法的規制の顕著な効果が得られている。

3. 動物実験代替法(1): in vitro 試験

近年、EU では、化学物質の登録・評価・認可・及び制限 (REACH) による規制に伴い、健康と環境の保護のための化学物質の規制が厳しくなっている。また、REACH では、動物実験に代わる評価を推奨しており、感作性物質の試験について動物実験代替法の開発が望まれている⁴⁻⁷⁾。近く、化粧品の試験では、動物実験を使うことが禁止される動向である。研究開発中の In vitro 試験、QSAR ソフト、感作性を評価するための 바이오インフォマティクス的手法などを紹介する。これらは、非動物試験の開発とともに費用を抑え時間短縮を行うことも目的としている。In vitro 試験としては、Keratinocyte response, Dendritic cell, T-cell induction, あるいは、Peptide reactivity を利用した感作性物質試験への応用化を目指した研究が行われている⁸⁻¹⁰⁾。Keratinocyte response の利用として、3D reconstructed human epidermal models が開発されており、今後の皮膚感作性物質試験への応用が期待される¹¹⁾。

4. 動物実験代替法(2): QSAR

EU における QSAR (QSARs: quantitative structure-activity relationships) ソフトの最新情報について紹介する¹²⁻¹³⁾。

表.1 QSAR ソフトによる結果とLLNA結果の比較

QSAR Software	Chemicals					
	hydroxycitronellal CAS No.:107-75-5		dimethyl carbonate CAS No.:616-38-6		pentachlorophenol CAS No.:616-38-6	
DEREK	alert found	positive	no alert found	negative	no alert found	negative
SMARTs	alert found	positive	no alert found	negative	alert found	positive
TopKAT	probability<0.7	negative	probability<0.7	negative	probability<0.7	negative
TIME-SS	alert found	positive	no alert found	negative	no alert found	negative
MultiCASE	alert found	positive	no alert found	negative	alert found	positive
LLNA test	positive		negative		?	

QSAR は、global モデルと local モデルの 2 つに大別できるが、local モデルは、特定の化学物質類への適用のみであるが、global モデルは、全ての化学物質への適用を目的とする。Global な QSAR モデルとして以下のソフト (DEREKfw, SMARTs, OASIS/TIMESS, TopKAT MultiCASE) を用いて数種の化学物質のそれぞれの感作性試験の結果、及び LLNA の結果との比較を表 1 に示した。

Hydroxycitronellal の alert の出た QSAR ソフトの結果及び、dimethyl carbonate の各 QSAR ソフトの結果は、LLNA の結果と良く一致している。一方、pentachlorophenol については、QSAR ソフト毎に positive と negative に結果が分かれた。LLNA の結果は出ていないため、どちらがより信頼性があるか判断は困難であるが、alert found を有意とみなすと positive と評価できそうである。今後、QSAR は、第一段階のスクリーニングの手段として使い、その後、その他の試験方法と併せて行うなど、動物実験代替法としての有効な利用が進められていくと考えられる。

5. 動物実験代替法(3): バイオインフォマティクス

感作性物質を評価するために、ある物質

に曝露された際に、どのような遺伝子が発現するのかを予め、in vitro にて調べておくことも有用である。RIVM では、近年、毒性学分野でも使われている DNA マイクロアレイ及び、バイオインフォマティクスの手法を用いて、感作性物質曝露による遺伝子発現プロファイルを明らかにする研究を行っている¹⁴⁾。

D. 考察

EU での RREACH 規制等により動物実験が厳しくなっていくなか、QSAR は、感作性物質の第一段階の試験手段として、動物実験代替法としての有効な利用が進められていくと考えられる。EU の動物実験に関する規制は、今後、世界標準になることも考えられるため、日本においても動物実験代替法の開発と応用を進めていく必要があるものと考えられた。

E. 結論

EU において消費者製品中の物質の法的規制により感作性物質由来の接触皮膚炎の減少など顕著な効果が得られていた。皮膚感作性試験について、今後、更なる動物実験代替法の開発が重要となると考えられた。

また、今回の訪問を通じて、日本における感作性物質リスト作成を今後進める上での有益な議論・交流を行うことができた。

F. 謝辞

オランダ・国立公衆衛生環境研究所 (RIVM)、Henk van Loveren 教授および、研究員の皆様に深く感謝致します。

G. 引用文献

1). Wijnhoven SWP, Ezendam J, Schuur AG, van Loveren H, van Engelen JGM. (2008) Allergen in consumer products. RIVM Report 320025001/2008.

2). Thyssen JP, Johansen JD, Carlsen BC, Menne T. (2009) Prevalence of nickel and cobalt allergy among female patients with dermatitis before and after Danish government regulation: a 23-year retrospective study. *J Am Acad Dermatol* 61(5): 799-805.

3). Caroe C, Andersen KE, Mortz CG. (2011) Fluctuations in the prevalence of nickel and cobalt allergy in eczema patients patch tested after implementation of the nickel regulation in Denmark. *Contact Dermatitis* 64(3): 126-131.

4). Vandebriel RJ, van Loveren H. (2010) Non-animal sensitization testing: state-of-the-art. *Crit Rev Toxicol* 40(5): 389-404.

5). Lankveld DP, Van Loveren H, Baken KA, Vandebriel RJ. (2010) In vitro testing for direct immunotoxicity: state of the art. *Methods Mol Biol* 598: 401-423.

6). Vandebriel RJ, Pennings JL, Baken KA, Pronk TE, Boorsma A, Gottschalk R, et al. (2010) Keratinocyte gene expression profiles discriminate sensitizing and irritating compounds. *Toxicol Sci* 117(1): 81-89.

7). Vandebriel RJ, Van Och FM, van Loveren H. (2005) In vitro assessment of sensitizing activity of low molecular weight compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 207(2 Suppl): 142-148.

8). Jowsey IR, Basketter DA, Westmoreland C, Kimber I. (2006) A future approach to measuring relative skin sensitising potency: a proposal. *J Appl Toxicol* 26(4): 341-350.

9). Basketter D, Maxwell G. (2007) In vitro approaches to the identification and characterization of skin sensitizers. *Cutan Ocul Toxicol* 26(4): 359-373.9).

10). Grindon C, Combes R, Cronin MT, Roberts DW, Garrod JF. (2008) An integrated decision-tree testing strategy for skin sensitisation with respect to the requirements of the EU REACH legislation. *Altern Lab Anim* 36 Suppl 1: 75-89.

11). Uchino T, Takezawa T, Ikarashi Y. (2009) 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(2): 333-337.

12). Patlewicz G, Roberts DW, Uriarte E. (2008) A comparison of reactivity schemes for the prediction skin sensitization potential. *Chem Res Toxicol* 21(2): 521-541.

13). Hulzebos E, Gunnarsdottir S, Rila JP, Dang Z, Rorije E. (2010) An Integrated Assessment Scheme for assessing the adequacy of (eco)toxicological data under REACH. *Toxicol Lett* 198(2): 255-262.

14). Vandebriel RJ, Pennings JL, Baken KA, Pronk TE, Boorsma A, Gottschalk R, et al. (2010) Keratinocyte gene expression profiles discriminate sensitizing and irritating compounds. *Toxicol Sci* 117(1): 81-89.



RIVM 研究所の研究室での討論風景。