研究発表 2

LLNA: BrdU-ELISA 法（OECD TG442B）の結果を用いる皮膚感作性の定量リスク評価

発　表　者：福島　麻子（安全性評価技術研究所）
共同研究者：林　多恵　（安全性評価技術研究所）
共同研究者：武吉　正博（安全性評価技術研究所）

1.　はじめに

皮膚感作性により生じる接触性皮膚炎は、一旦感作された人では極めて微量のばく露でアレルギー反応が誘発され、影響が長く続く場合があるため、労働安全衛生上極めて重要なリスクファクターである。しかしながら、労働安全衛生管理においては主に吸入ばく露影響に基づく職業ばく露限界（Occupational Exposure Limit：OEL）の設定が行われており、皮膚感作性については感作性があることを示す注意喚起に留まっているのが現状である。一方、香粧品に含まれる香料等については、消費者の皮膚感作性リスク管理を目的とした定量リスク評価手法が開発されており、この中では、RI 法を用いたマウス局所リンパ節試験（LLNA）の結果及びヒトパッチテスト等のヒトの情報を基にヒトで感作性を誘発しないと考えられる用量（No Expected Sensitizing Induction Level：NESIL）を推定し、NESIL に調整係数を適用することにより許容ばく露レベルを設定する手法が提案されている [1]。本研究では、香粧品中化学物質の消費者向け定量リスク評価手法を参考に、LLNA の非 RI 法として広く用いられている LLNA: BrdU-ELISA 法（OECD TG442B）で陽性と判定される化学物質濃度（EC1.6）を用いた作業者の皮膚感作性リスク管理のための設備表面の残留閾値の設定手法を開発した。

2.　方法

2.1　作業者の感作性定量リスク評価のための残留閾値算出式の検討

香粧品中化学物質の定量リスク評価における許容ばく露レベル算出式 [1] を参考に、作業者の皮膚感作性リスク管理のための設備表面の残留閾値の算出式を検討した（式 1）。このうち EC1.6（μg/cm^2）は、LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる EC1.6（%）を式 2 により単位面積当たりの用量（μg/cm^2）に換算して求めることとした。式 1 の調整係数の要素として、種間差、個体差、ばく露条件を考慮した係数を設定することとした。

$$\text{残留閾値（μg/100 cm}^2\text{）} = \frac{\text{LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる EC1.6（μg/cm}^2\text{）}}{\text{調整係数}} \times 100 \qquad \text{（式 1）}$$

$$\text{EC1.6（μg/cm}^2\text{）} = \text{EC1.6（\%）} \times 10^4\ \text{（μg/mL）} \times \text{適用量（0.025 mL/ear）/適用面積（1 cm}^2\text{/ear）} \qquad \text{（式 2）}$$

2.2　残留閾値算出のための調整係数の検討

種間差の検討のため、Naumann & Arnold (2019)[2] を参考に EC1.6 データ[3、4]及びヒトパッチテスト NOEL データ[5,6]を収集し、単位面積当たりの用量に換算した EC1.6（μg/cm^2）とヒトパッチテスト NOEL の比の解析を行った。個体差、ばく露条件の調整係数については、皮膚感作性アセスメント係数について検討が行われた既報[1、2、7～10]を参考に検討を行った。

2.3　残留閾値の算出と既存の感作性強度分類との比較

2.2 の検討の結果に基づき算出式の調整係数を決定した上で皮膚感作性リスク管理のための設備表面の残留閾値を算出した。算出した残留閾値と既存の感作性強度分類（Human class 及び GHS 分類の感作性細区分（1A、1B））の比較を行った。

3.　結果

3.1　調整係数の検討結果

データ収集の結果、33 物質の EC1.6 が得られ、このうち 20 物質のヒトパッチテスト NOEL が得られた。種間差の検討として EC1.6/ヒトパッチテスト NOEL 比を解析した結果、当該比は 0.07～7.47 に分布し、平均値 2.13、標準偏差（SD）2.10、正規分布を仮定した 95 パーセンタイル値（平均値＋2SD）は 6.33 となった。この結果に基づき、種間差の調整係数を 6 と設定した。個体差、ばく露条件の調整係数の検討結果を表 1 に示す。個体差の調整係数は、既報で概ね 10 が採用されていることを踏まえ本検討でも 10 を採用した。ばく露条件に関する調整係数として、作業者リスク評価においてもばく露が長期間にわたる可能性が考えられることを考慮し、頻度／期間についての調整係数 3 を適用した。

表 1　既報等で提案された調整係数と本研究での検討結果

調整係数の要素		Api *et al.* (2008)[1]	Basketter & Safford (2016)[7]	IDEA project (2016)[8]	SCCS (2018)[9]	ECHA (2012)[10]	Naumann & Arnold (2019)[2]	本研究
種間差		－[a]	－[a]	－[a]	3	10[b]	6 (EC3/ﾋﾄﾊﾟｯﾁﾃｽﾄ NOEL 比に基づく	6 EC1.6/ﾋﾄﾊﾟｯﾁﾃｽﾄ NOEL 比に基づく
個体差		10	10	10	10	5, 10	NOEL 比に基づく)	10 個体差を考慮
ばく露条件	ﾏﾄﾘｯｸｽ/製品	1, 3[c], 10	0.3, 1, 3[c]	0.3, 1, 3[c]	－	1～10	3	－[f]
	頻度/期間	1, 3[c], 10[d]	1, 3[c]	1, 3[c]	3	1～10	3	3 ばく露が長期間にわたる可能性を考慮
	閉塞条件		－	－	－			－[f]
	皮膚の状態/部位		1, 3[c], 10	1, 3[c], 10	3, 10			－[f]
調整係数積		10～300	3～1,000[e]	30～300	300～1,000[e]	50～10,000[e]	ca. 50	180

a: NESIL はヒトでの確認試験に基づく値又は LLNA EC3 から推定された値であるため種間差の調整係数は不要
b: LLNA EC3 とヒトの試験結果（NOAEL/LOAEL）との間に良好な一致があり、最小値を評価値導出に用いる場合は不要
c: 3.16（10 の half log）の実用的な表記
d: 膣粘膜で使用されるタンポン（20 を適用）を除く
e: 原著では調整係数積は算出されていない
f: 消費者製品特有の要素と判断

3.2　残留閾値の算出と既存の感作性強度分類との比較結果

調整係数の検討結果に基づき、式 1 の算出式に調整係数積（180）を適用し、33 物質について EC1.6 に基づく残留閾値を算出した（表 2）。残留閾値の値は 1.3～10,000 μg/100 cm^2（0.001～10 mg/100 cm^2）に分布した。

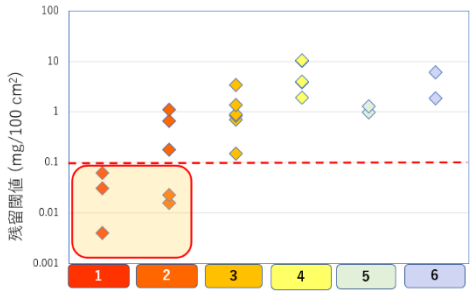
残留閾値と既存の感作性強度分類との比較として、Human class と比較した（図 1）。この結果、Human class 1（接触性アレルギーの広範な証拠がある）又は 2（class 1 ほどではないが接触性アレルギーが頻繁に生じる）感作性物質はいずれも、残留閾値 <0.1 mg/100 cm^2 の範囲にあることが示された。

さらに、算出した残留閾値と皮膚感作性の GHS 分類（細区分 1A（強い感作性物質）、1B（低～中等度の感作性物質））を比較した（図 2）。この結果、残留閾値 <0.1 mg/100 cm^2 の範囲にある物質は GHS 細区分 1A と一致し、残留閾値 <1 mg/100 cm^2 の範囲にある物質の一部も GHS 細区分 1A と一致することが示された。

表 2　33 物質の残留閾値算出結果

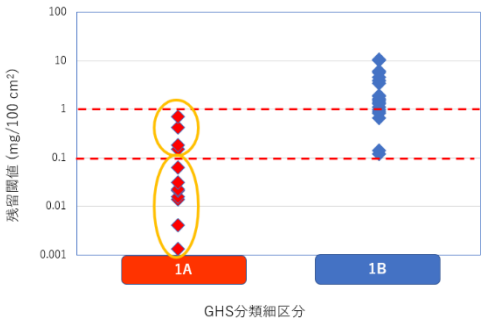
化合物名	LLNA EC1.6 (%)	LLNA EC1.6 (μg/cm^2)	残留閾値* (μg/100 cm^2)
CM 溶液	0.0095	2.38	1.3
1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン	0.029	7.25	4.0
塩化コバルト(II)	0.10	25	14
グルタルアルデヒド	0.115	28.8	16
p-ベンゾキノン	0.15	37.5	21
ホルムアルデヒド	0.163	40.8	23
1,4-フェニレンジアミン	0.22	55	31
ジフェニルシクロプロペン	0.45	113	63
トリメリット酸無水物	0.862	216	120
硫酸ニッケル	1.027	257	140
4-(メチルアミノ)フェノール硫酸塩	1.081	270	150
イソオイゲノール	1.3	325	180
3-アミノフェノール	2.99	748	420
シンナムアルデヒド	4.808	1,202	670
2-メルカプトベンゾチアゾール	5.03	1,258	700
オイゲノール	6.03	1,508	840
イミダゾリジニル尿素	6.43	1,608	890
α-ヘキシルシンナムアルデヒド	7.07	1,768	980
マレイン酸ジエチル	8.049	2,012	1,100
ミリスチン酸 イソプロピル	9.404	2,351	1,300
シンナミルアルコール	10	2,500	1,400
4-クロロアニリン	11.029	2,757	1,500
シトラール	11.7	2,925	1,600
ドデシル硫酸ナトリウム	13.334	3,334	1,800
ヒドロキシシトロネラール	13.636	3,409	1,900
安息香酸フェニル	24.3	6,075	3,400
リナロール	27.596	6,899	3,800
エチレングリコールジメタクリラート	28.18	7,045	3,900
アクリル酸エチル	33.333	8,333	4,600
シクラメンアルデヒド	41.496	10,374	5,800
キシレン	43.3	10,825	6,000
アニリン	73.596	18,399	10,000
メタクリル酸メチル	75	18,750	10,000

＊ 残留閾値は有効数字 2 桁として四捨五入し、μg/100cm^2 で表記した



1: 接触性アレルギーの広範な証拠がある
2: class 1 ほどではないが接触性アレルギーが頻繁に生じる
3: 接触性皮膚炎の要因であり class 2 より高いばく露が必要
4: ばく露レベルによって稀に接触性皮膚炎を生じる
5: 特殊な状況を除き、接触性皮膚炎の要因となることは稀
6: 本質的に接触性アレルギーの証拠はない

図 1　残留閾値と Human class の比較結果



1A: 強い感作性物質
1B: 低～中等度の感作性物質

図 2　残留閾値と GHS 分類の比較結果

4.　まとめ

本研究において、作業者リスク管理のための皮膚感作性定量リスク評価に用いる許容ばく露レベルとして、LLNA: BrdU-ELISA 法で陽性と判定される化学物質濃度（EC1.6）に基づく残留閾値の設定手法を開発した。本研究で開発した手法に基づき算出した残留閾値と既存の皮膚感作性強度分類を比較した結果、Human class 1 又は 2 の感作性物質、GHS 分類細区分 1A の物質の残留閾値は <0.1 mg/100 cm^2 となり、LLNA: BrdU-ELISA 法 EC1.6 は、作業者の感作リスクを最小限に抑えるために必要な残留閾値を知るための重要な情報となることが示された。

本研究成果は 2022 年 4 月 1 日付で Journal of Applied Toxicology に受理されました。
Fukushima A, Hayashi T, Takeyoshi M (2022) Acceptable Surface Limits (ASLs) of skin sensitizers derived from the local lymph node assay (LLNA): BrdU-ELISA EC1.6 values and their relationships to known sensitization potency information Journal of Applied Toxicology. doi: 10.1002/jat.4339 (***in press***)

参考文献

1) Api *et al.* (2008) Dermal sensitization quantitative risk assessment (QRA) for fragrance ingredients. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 52(1): 3-23.
2) Naumann & Arnold (2019) Setting surface wipe limits for skin sensitizers. Toxicology and Industrial Health, 35(9): 614-625.
3) ICCVAM (2010) Test method evaluation report on the Murine Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA. A nonradioactive alternative test method to assess the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. NIH Publication Number 10-7552.
4) Kobayashi *et al.* (2020) Applicability of the proposed GHS subcategorization criterion for LLNA: BrdU-ELISA (OECD TG442B) to the CBA/J strain mouse. Journal of Applied Toxicology, 40(10), 1435-1439.
5) Basketter *et al.* (2005) Predictive identification of human skin sensitization thresholds. Contact Dermatitis, 53(5), 260-267.
6) Basketter *et al.* (2014) Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. Dermatitis, 25(1), 11-21.
7) Basketter & Safford (2016) Skin sensitization quantitative risk assessment: A review of underlying assumptions. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 74, 105-116.
8) IDEA Project (2016) Final report on the QRA2. Skin sensitisation quantitative risk assessment for fragrance ingredients.
9) SCCS (2018) Opinion on skin sensitisation quantitative risk assessment for fragrance ingredients (QRA2), SCCS/1589/17.
10) ECHA (2012) Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.8: Characterisation of dose [concentration]-response for human health (version: 2.1)