

Samuele Burastero¹ e Stefano Todeschi²¹Laboratorio immunologia e allergologia molecolare, San Raffaele Scientific Institute - Milano
s.burastero@hsr.it - www.alltox.it²Laboratori Abich - Verbania - todeschi@abich.it - www.abich.it

Sensibilizzazione cutanea

Parole chiave

Sensibilizzazione

Test *in vivo*Test *in vitro*

Test alternativi

Limiti di HRIPT e metodi alternativi

Summary

The evaluation of the allergic risk profile of cosmetic and of large consume products, is key to the filing of the valid safety evaluations, also considering that roughly 20% of the general population is affected by allergic diseases or disturbances in Western industrialized countries.

*In principle the HRIPT (Human Repeated Insult Patch Test) is the single assay, which more comprehensively recapitulates the actual *in vivo* exposure to any substance or finished products to be used on human skin. However, serious ethical and technical concerns do not recommend its widespread application. On the other hand, a remarkable amount of knowledge have been accumulating in the last decade on the mechanisms underlying the establishment of the allergic reaction to xenobiotics, making it possible to perform scientifically sound tests, some of which were allowed to enter the pre-validation stage by regulatory Authorities.*

These assays, if properly integrated and interpreted do allow to acquire information by far more reliable than those generated by HRIPT, and to operate on formulations of cosmetics and toiletries to the advantage of consumer health and product quality.

Riassunto

La definizione del profilo di rischio allergologico di prodotti cosmetici e prodotti di largo consumo in generale è una componente indispensabile della valutazione di sicurezza, anche a fronte dell'attestarsi delle patologie allergiche a livelli di incidenza prossimi al 20% della popolazione generale. Il test ad insulto ripetuto (*Human Repeated Insult Patch Test*, HRIPT) è in linea di principio il saggio *in vivo* che verifica nella maniera empiricamente più coerente con la vita reale l'eventuale insorgenza di allergie cutanee a seguito dell'applicazione di una materia prima o di un prodotto finito sulla pelle dei soggetti sperimentali.

Tuttavia, insormontabili limiti etici e tecnici ne sconsigliano o impediscono l'utilizzo nella quasi totalità delle situazioni.

D'altro canto, le conoscenze dei meccanismi alla base della generazione della risposta infiammatoria di tipo allergico hanno reso possibile la messa a punto di una ragguardevole mole di test scientificamente validi, alcuni dei quali avviati alla pre-validazione dalle autorità regolatorie.

Questi test, opportunamente integrati ed interpretati consentono di acquisire informazioni di gran lunga più affidabili di quelle derivate con HRIPT, e rendono possibile la valutazione di sicurezza delle formulazioni cosmetiche a tutto vantaggio della sicurezza dei consumatori e della qualità dei prodotti.

Introduzione

Il test ad insulto ripetuto (*Human Repeated Insult Patch Test*, HRIPT) è utilizzato da oltre un secolo per valutare la sicurezza, in termini di capacità d'indurre sensibilizzazione, di prodotti destinati al contatto con la cute.

HRIPT è oggi una scelta criticabile sia per considerazioni etiche, sia per i suoi limiti scientifici, sia per l'attuale disponibilità di un complesso di test e conoscenze alternative per la definizione del rischio allergologico. Solo in rarissime circostanze HRIPT, dopo attenta valutazione del rapporto rischio-beneficio può ancora essere eticamente e scientificamente giustificato, ad esempio quando si debba confermare la mancanza di potenziale sensibilizzante già verificata con altri metodi. Nella grande maggioranza delle situazioni non esistono motivazioni per legittimarne l'ampio utilizzo tuttora vigente (1).

A nostra conoscenza quasi tutti i test di HRIPT attualmente effettuati hanno lo scopo di generare rassicurazione presso i committenti circa il rischio di sensibilizzazione allergica, senza che ciò sia sostenuto da considerazioni scientifiche né di altro genere, incluse presunte, quanto infondate, garanzie di tipo legale nei riguardi di eventuali danni subiti da terzi a seguito dell'applicazione dei prodotti.



HRIPT e suoi limiti

Il test, nelle sue linee generali, consiste in una prima esposizione della cute, protratta per alcuni giorni consecutivi, alla sostanza in esame applicata in modalità occlusiva (periodo di induzione). Si coinvolge un gruppo di 50-200 volontari ai quali, dopo due settimane di interruzione, la stessa sostanza viene ri-applicata sia nelle stesse sedi di induzione che in aree non precedentemente utilizzate, per una durata di 24-48 ore (periodo di scatenamento). Al di là delle numerose varianti di questo schema generale, il riferimento più accreditato è il lavoro di Stotts (2) con integrazioni e commenti (3,4). Il limite etico di HRIPT è intrinseco alla definizione di eticità degli studi scientifici: qualunque studio che coinvolga volontari umani non può considerarsi etico se non è scientificamente fondato, secondo i criteri della Dichiarazione di Helsinki del 1964, e successivi emendamenti. Il fatto che HRIPT, sia pure condotto a regola d'arte, possa indurre sensibilizzazione sia ad allergeni forti che deboli è stato documentato da tempo (5,6), ed è ben noto per esperienza comune. Sebbene si possa argomentare che ciò prova la validità intrinseca del test, si devono considerare i seguenti problemi:

- 1 Il primo limite ben riconosciuto, di HRIPT, risiede nel fatto che non è possibile prevedere con un test effettuato su una o poche centinaia di volontari (spesso si ricorre a gruppi di sole 50 persone) l'esito dell'utilizzo dello stesso prodotto su una vasta popolazione di consumatori. In particolare, qualunque sensibilizzazione indotta con una frequenza inferiore a 1% molto difficilmente può essere predetta con HRIPT (7). Questo singolo fatto rende scientificamente insostenibile la validità di HRIPT nella maggior parte dei casi.
- 2 Il secondo limite evidente attiene alla modalità di esposizione alla sostanza da saggiare, che essendo applicata in modo occlusivo non riproduce l'utilizzo normale (e nemmeno quello ragionevolmente eccessivo) della medesima.
- 3 A differenza degli effetti transitori potenzialmente indotti dai test che valutano la tolleranza cutanea in termini di irritazione, l'induzione di sensibilizzazione con HRIPT configura un danno di lunga durata, o permanente, che può interferire con la vita quotidiana del paziente, con vari livelli di gravità.

Test preclinici

Dai test su cavie all'LLNA

Per molti anni, la valutazione del rischio allergologico di sostanze e prodotti finiti destinati al contatto con la cute è stata effettuata con test sulle cavie, che sulla base delle conoscenze di allora hanno in effetti consentito una valutazione di sicurezza preventiva nel caso di molte sostanze ad elevato potere sensibilizzante. Alla luce dello stato dell'arte delle conoscenze scientifiche attuali sulla sensibilizzazione allergica, questi test appaiono oggi a nostro giudizio relativamente poco giustificati sul piano scientifico e piuttosto invasivi per gli animali utilizzati, sia per il numero di animali necessari, sia per le caratteristiche delle manipolazioni richieste.

Tali test, nelle diverse varianti sperimentali, hanno limiti oggettivi ben documentati quanto ad effettiva capacità di identificare il rischio di dermatite allergica (8,9). Più recentemente è stato validato nell'Unione Europea un nuovo test alternativo per la valutazione del rischio allergologico (*Local Lymph Node Assay*, LLNA), che ha il vantaggio di essere scientificamente fondato, di fornire risultati quantitativi e di ridurre quasi a zero la sofferenza animale (10-12). Di fatto, LLNA consente di predire la soglia di sensibilizzazione che si riscontrerebbe con un HRIPT, correla in modo soddisfacente con le evidenze cliniche, ed evita il ricorso sia agli aggressivi test su cavie che ai test sull'uomo. Nella sua versione ridotta (*reduced Local Lymph Node Assay*, rLLNA), applicabile a prodotti con un basso rischio predetto di sensibilizzazione, il test consente inoltre un'ulteriore sensibile riduzione del numero di topi utilizzati (13-15).

Pur essendo un test alternativo, LLNA ricorre tuttavia all'impiego di animali, per cui non è un test utilizzabile per i prodotti cosmetici, mentre risulta di elevato interesse per prodotti topici di altra natura, quali dispositivi medici, tessuti, farmaci e loro ingredienti.

I test in vitro

Le Autorità Regolatorie, anche su impulso dell'opinione pubblica, hanno da alcuni anni dato incremento alla ricerca finalizzata ad identificare e validare test *in vitro* che possano arricchire l'armamentario tecnico-culturale a disposizione del tossicologo per la definizione del profi-

lo di rischio allergologico. Sebbene non esistano a tutt'oggi test validati a questo scopo, sono state individuate chiaramente le direttrici lungo le quali la ricerca ha già dato i risultati più promettenti. In particolare, le cellule dendritiche sono state chiaramente identificate come gli elementi biologici cruciali per implementare questo obiettivo. Infatti, esse operano *in vivo* l'identificazione della 'natura' della sostanza con cui il sistema immune entra in contatto, e definiscono la sua successiva modalità di reazione, inclusa l'eventuale risposta allergica (16,17).

L'impegno dell'Unione Europea in questa direzione si è recentemente concluso con il progetto integrato *Sens-it-iv*, che in cinque anni, grazie alla collaborazione di partner industriali, accademici ed autorità regolatorie ha indagato le potenzialità di diverse metodiche *in vitro* per la valutazione del rischio di sensibilizzazione per allergeni topici e respiratori (www.sens-it-iv.eu). Nelle linee più generali, a conclusione del progetto, è stata affermata la necessità di consolidare i test *in vitro* che siano in grado di individuare in modo riproducibile gli eventi metabolici preliminari alla sensibilizzazione (trasformazione di proapteni in apteni), e che siano 'robusti' sul piano della riproducibilità. Inoltre, è stato sottolineato come i test più promettenti debbano essere coerenti con le conoscenze attuali, emergenti dalle varie discipline 'omiche', sfruttando l'identificazione simultanea di multipli eventi biologici, tra loro interdipendenti.

Tra i diversi e complessi metodi descritti nell'ambito di questo progetto l'approccio a due livelli (*two-tiered*) è apparso particolarmente importante nella definizione di protocolli da avviare alla pre-validazione. Tale strategia è basata sulla preliminare misura di IL-18 intracellulare prodotta da linee di cheratinociti esposti a sostanze sensibilizzanti, seguita, in caso di positività, da un secondo saggio indipendente che consente la valutazione della potenza allergica su colture 'cute-equivalenti'. Per quanto riguarda la predizione dell'allergenicità di apteni per via respiratoria, interessanti risultati sono derivati dallo studio di marcatori di attivazione in modelli di epitelio alveolare ricostituito, che hanno specifico interesse nella valutazione del rischio professionale di lavoratori esposti a sostanze chimiche ad allergenicità ignota.



Cellule dendritiche

Un ulteriore aspetto di estremo interesse emerso dagli studi coordinati da Sens-it-iv è stato lo sviluppo di test di migrazione di cellule dendritiche, ovvero di test atti a valutare simultaneamente l'attivazione nella linea di cellule di Langerhans MUTZ-3 di uno specifico set di geni coinvolti nella risposta allo stress ossidativo, che è notoriamente associato allo sviluppo di sensibilizzazione allergica.

Da ultimo, è di particolare rilievo la lista di sostanze sensibilizzanti, per contatto cutaneo, ovvero per via inalatoria, corredata dalla quantificazione della potenza allergenica e da una lista di molecole di controllo, che il progetto Sens-it-iv ha generato, mettendola a disposizione di tutti gli studiosi del settore come indispensabile punto di riferimento per la verifica di nuovi sistemi sperimentali finalizzati alla predizione *in vitro* della sensibilizzazione allergica. Nella *Tabella 1* sono riportate le sostanze chimiche di riferimento, identificate come apteni o pro-apteni (sono queste ultime le sostanze che acquisiscono capacità sensibilizzante a seguito di trasformazione metabolica) nell'ambito del succitato progetto. Le sostanze proteiche identificate come allergeni-prototipo da Sens-it-iv sono state omesse in quanto di interesse più specialistico.

Cellule monocitoidi umane

In questa cornice concettuale, una specifica evoluzione delle strategie per lo sviluppo di test *in vitro* per la predizione dell'allergenicità è costituita dall'utilizzo di linee stabili di cellule monocitoidi umane, quali le cellule THP-1. Le cellule dendritiche, infatti, richiedono una certa laboriosità nella preparazione, e pongono problemi di standardizzazione, come tipico di tutte le linee cellulari primarie, che devono essere ogni volta derivate *ad hoc* dal sangue periferico di donatori sani. THP-1 sono invece linee cellulari stabili, assai più agevoli per modalità di utilizzo e di mantenimento.

Ricerche in house

Non bisogna inoltre dimenticare un importante parametro, che non emerge dal complesso rapporto Sens-it-iv: e precisamente il costo e la semplicità esecutiva del test. Infatti per poter avere ampia diffusione un test deve avere anche un costo sostenibile e proorzionato in relazione all'informazione che ne scaturisce. Per

Tabella 1 Sostanze chimiche di riferimento per confronto nei futuri studi di allergeo-tossicità (Progetto europeo Sens-It-iv)

Apteni Cutanei (20)	Apteni Respiratori (6)	Controlli (20)
2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)	Diphenylmethane diisocyanate (MDI)	Sodium dodecyl sulphate (SDS)
Glutaraldehyde (GA)	Trimellitic anhydride (TMA)	Salicylic acid (SA)
Cinnamaldehyde (CIN)	Ammonium hexachloroplatinate (HCPT)	Phenol (Ph)
Tetramethyl thiuram disulfide (TMTD)	Hexamethylene diisocyanate (HDI)	Glycerol (Gly)
Resorcinol (Res)	Maleic anhydride (MA)	Lactic acid (Lac)
Oxazolone (Oxa)	Glutaraldehyde (GA)	Chlorobenzene (CB)
Glyoxal (Glx)		P-Hydroxybenzoic acid (PHBA)
2-Bromo-2-(bromomethyl) benzaldehyde (BA)		Diethyl phtalate (DEPH)
2-Mercaptobenzothiazole (MBT)		Octanoic acid (OA)
4-Nitrobenzylbromide (NBB)		Zinc sulphate (ZS)
Formaldehyde (Form)		4-Aminobenzoic acid (PABA)
Ethylenediamine (ED)		Methyl salicylate (MS)
2-Hydroxyethyl acrylate (HEA)		Ethyl vanillin (EV)
Hexylcinnamic aldehyde (HCA)		Isopropanol (Iso)
Potassium dichromate (PDC)		Dimethyl formamide (DF)
Penicillin G (PenG)		1-Butanol (But)
MCI/MI		Potassium permanganate (PPM)
2-Aminophenol (AP)		Propylene glycol (PG)
Geraniol (Ger)		Tween 20 (T20)
2-Nitro-1,4-phenylenediamine (NPD)		
Proapteni Cutanei (4)		
Isoeugenol (Iso)		
Eugenol (Eug)		
Cinnamic alcohol (CA)		
Paraphenylenediamine (PPD)		

questo motivo, è fondamentale cercare di utilizzare tecniche che semplifichino l'esecuzione del test ottimizzando il rapporto tra costi e informazione. Il nostro laboratorio, in accordo con i risultati ottenuti in modo indipendente da altri ricercatori che hanno lavorato sullo stesso argomento (18-20), ha prodotto specifici lavori scientifici, pubblicati su riviste internazionali *peer-reviewed*, nei quali sono state messe a punto le condizioni più adeguate per rilevare la capacità d'indurre *in vitro* l'attivazione di specifici marcatori

biologici associati alla sensibilizzazione allergica utilizzando THP-1 esposte a sostanze con capacità allergizzante nota (21-25). In breve, nel nostro laboratorio misuriamo tramite citofluorimetria la modulazione delle due principali molecole co-stimolatorie (CD80 e CD86) a seguito di esposizione *in vitro* per 48 ore a dosi sub-tossiche del prodotto in esame. Le molecole CD80 e CD86 sono dette co-stimolatorie perché svolgono la funzione di fornire il cosiddetto 'segnale 2' nell'ambito della sinapsi immunologica,

ovvero della struttura di interazione tra i linfociti T specifici per l'antigene (in questo caso la sostanza potenzialmente sensibilizzante, ovvero in grado di indurre allergia) e le cellule presentanti l'antigene (*Antigene Presenting Cells*, APC, tipicamente, cellule dendritiche, di cui le THP1 sono surrogati).

Una vasta e coerente letteratura sull'argomento dimostra che sostanze in grado di stimolare il sistema immune, ma non sostanze immunologicamente inerti, sono in grado di aumentare l'espressione di tali molecole sulla membrana delle APC. Gli studi che abbiamo preliminarmente condotto, in coerenza con i risultati di altri ricercatori (26-29) hanno confermato che le sostanze sensibilizzanti, ma non quelle irritanti utilizzate come controllo, aumentano l'espressione dei CD80 e/o CD86 in questo sistema sperimentale. Inoltre, una pluriennale esperienza con questo test, sia su materie prime che su prodotti finiti, ci ha confermato la sua utilità nella formulazione del profilo di rischio allergologico di farmaci, dispositivi medici, cosmetici e *toiletries*.

Conclusioni

Test basati su THP-1 sono stati inseriti dall'*European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) tra i test da avviare alla pre-validazione (30), ed analogo sforzo è prodotto dall'associazione europea dell'industria cosmetica (*Cosmetics Europe - The Personal Care Association; ex Colipa*) (31).

Queste metodologie, che sono quindi in linea con le indicazioni dell'Unione Europea circa l'auspicato sviluppo di futuri test validati per la predizione della sensibilizzazione allergica, contribuiscono già oggi alla definizione del profilo di rischio allergologico senza dover ricorrere a test invasivi come HRIPT.

Da ultimo, nel delineare il profilo di rischio allergologico è necessario considerare il cospicuo potere predittivo derivante dalla valutazione critica del contenuto in sostanze sensibilizzanti eventualmente presenti nel prodotto finito, come ingredienti o come contaminanti, ovvero molecole generate per trasformazione metabolica degli stessi. Tali sostanze possono

essere note, ovvero può porsi la necessità di ricercarle, quando se ne sospetta la presenza, talora in limitate quantità (metalli pesanti in tracce, allergeni dei profumi, conservanti derivati dalle materie prime, formaldeide rilasciata). Anche queste valutazioni sono essenziali a costruire un adeguato dossier circa il profilo di rischio allergologico di un prodotto finito.

In questo contesto, non solo la concentrazione ma anche la possibilità di penetrazione cutanea di tali sostanze devono essere prese in considerazione. Anche in questo caso, se queste informazioni non sono note, si può procedere alla loro misura con adeguati test di assorbimento percutaneo.

Queste informazioni, criticamente integrate con i risultati dei test *in vivo* e *in vitro* sopra ricordati, consentono di costruire un dossier di valutazione del rischio allergologico aggiornato alle conoscenze del 2012, e possono razionalmente indirizzare alla scelta di formulazioni dotate di allergenicità assente o assai limitata, in modo di gran lunga più efficiente e giustificato, rispetto all'utilizzo di HRIPT.

Bibliografia

- Basketter DA (2009)**
The human repeated insult patch test in the 21st century: a commentary
Cutan Ocul Toxicol **28**(2) 49-53
- Stotts J (1980)**
Planning, conduct and interpretation of human predictive sensitization patch tests.
In: *Current Concepts in Cutaneous Toxicity*
Academic Press (Elsevier), St Louis, MO-USA
- Marzulli FN, Maibach HI (1980)**
Further studies of effects of vehicles and elicitation concentration in experimental contact sensitization testing in humans
Contact Dermatitis **6**(2) 131-133
- McNamee PM, Api AM, Basketter DA, Frank Gerberick G, Gilpin DA et al (2008)**
A review of critical factors in the conduct and interpretation of the human repeat insult patch test
Regul Toxicol Pharmacol **52**(1) 24-34
- Marzulli FN, Maibach HI (1974)**
The use of graded concentrations in studying skin sensitizers: experimental contact sensitization in man
Food Cosmet Toxicol **12**(2) 219-227
- Marzulli FN, Maibach HI (1980)**
Contact allergy: predictive testing of fragrance ingredients in humans by Draize and Maximization methods
J Environ Pathol Toxicol **3**(5-6) 235-245
- Henderson CR, Riley EC (1945)**
Certain statistical considerations in patch testing
J Invest Dermatol **6** 227-229
- Menne T, Wahlberg JE (2002)**
Risk assessment failures of chemicals commonly used in consumer products
Contact Dermatitis **46**(4) 189-190
- Dillarstone A (1997)**
Cosmetic preservatives
Contact Dermatitis **37**(4) 190
- Basketter DA, Clapp C, Jefferies D, Safford B, Ryan CA et al (2005)**
Predictive identification of human skin sensitization thresholds
Contact Dermatitis **53**(5) 260-267
- Basketter DA, Wright ZM, Warbrick EV, Dearman RJ, Kimber I et al (2001)**
Human potency predictions for aldehydes using the local lymph node assay
Contact Dermatitis **45**(2) 89-94
- Felter SP, Robinson MK, Basketter DA, Gerberick GF (2002)**
A review of the scientific basis for uncertainty factors for use in quantitative risk assessment for the induction of allergic contact dermatitis
Contact Dermatitis **47**(5) 257-266
- Api AM, Basketter DA, Cadby PA et al (2008)**
Dermal sensitization quantitative risk assessment (QRA) for fragrance ingredients
Regul Toxicol Pharmacol **52**(1) 3-23



- 14 Schneider K, Akkan Z (2004)**
Quantitative relationship between the local lymph node assay and human skin sensitization assays
Regul Toxicol Pharmacol 39(3) 245-255
- 15 Griem P, Goebel C, Scheffler H (2003)**
Proposal for a risk assessment methodology for skin sensitization based on sensitization potency data
Regul Toxicol Pharmacol 38(3) 269-290
- 16 Balls M, Sabbioni E (2001)**
Promotion of research on *in vitro* immunotoxicology
Sci Total Environ 270(1-3) 21-25
- 17 Casati S, Aeby P, Basketter DA, Cavani A, Gennari A et al (2005)**
Dendritic cells as a tool for the predictive identification of skin sensitisation hazard
Altern Lab Anim 33(1) 47-62
- 18 Yoshida Y, Sakaguchi H, Ito Y, Okuda M, Suzuki H (2003)**
Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naive THP-1 cell line
Toxicol In Vitro 17(2) 221-228
- 19 Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H (2007)**
Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens
Toxicol In Vitro 21(3) 428-437
- 20 Miyazawa M, Ito Y, Kosaka N et al (2008)**
Role of MAPK signaling pathway in the activation of dendritic type cell line, THP-1, induced by DNCB and NiSO₄
J Toxicol Sci 33(1) 51-59
- 21 Smith AP, Paolucci C, Di Lullo G et al (2005)**
Viral replication-independent blockade of dendritic cell maturation and interleukin-12 production by human herpesvirus 6
J Virol 79(5) 2807-2813
- 22 Paolucci C, Burastero SE, Rovere-Querini P, De Palma C, Falcone S et al (2003)**
Synergism of nitric oxide and maturation signals on human dendritic cells occurs through a cyclic GMP-dependent pathway
J Leukoc Biol 73(2) 253-262
- 23 Bocchietto E, Paolucci C, Breda D, Sabbioni E, Burastero SE (2007)**
Human monocytoïd THP-1 cell line versus monocyte-derived human immature dendritic cells as *in vitro* models for predicting the sensitizing potential of chemicals
Int J Immunopathol Pharmacol 20(2) 259-265
- 24 Burastero SE, Paolucci C, Breda D, Ponti J, Munaro B et al (2006)**
Chromium (VI)-induced immunotoxicity and intracellular accumulation in human primary dendritic cells
Int J Immunopathol Pharmacol 19(3) 581-591
- 25 Paolucci C, Ponti J, Fabbri MV et al (2007)**
Platinum group elements enhance the allergic immune response by acting on dendritic cells
Int Arch Allergy Immunol 143(3) 225-236
- 26 Arkusz J, Stepnik M, Sobala W et al (2010)**
Prediction of the contact sensitizing potential of chemicals using analysis of gene expression changes in human THP-1 monocytes
Toxicol Lett 199(1) 51-59
- 27 Ade N, Leon F, Pallardy M, Peiffer JL, Kerdine-Romer S et al (2009)**
HMOX1 and NQO1 genes are upregulated in response to contact sensitizers in dendritic cells and THP-1 cell line: role of the Keap1/Nrf2 pathway
Toxicol Sci 107(2) 451-460
- 28 An S, Kim S, Huh Y, Lee TR et al (2009)**
Expression of surface markers on the human monocytic leukaemia cell line, THP-1, as indicators for the sensitizing potential of chemicals
Contact Dermatitis 60(4) 185-192
- 29 Ashikaga T, Hoya M, Itagaki H, Katsumura Y, Aiba S (2002)**
Evaluation of CD86 expression and MHC class II molecule internalization in THP-1 human monocyte cells as predictive endpoints for contact sensitizers
Toxicol In Vitro 16(6) 711-716
- 30 Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M et al (2009)**
A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA)
Altern Lab Anim 38(4) 275-284
- 31 Aeby P, Ashikaga T, Bessou-Touya S, Schepky A, Gerberick F et al (2010)**
Identifying and characterizing chemical skin sensitizers without animal testing: Colipa's research and method development program
Toxicol In Vitro 24(6) 1465-1473