

薬生薬審発 0111 第 1 号  
平成 30 年 1 月 11 日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長  
（公印省略）

化粧品・医薬部外品の安全性評価のための複数の皮膚感作性試験代替法を  
組合せた評価体系に関するガイダンスについて

今般、「医薬品等の安全性評価に関する in vitro 試験（代替法）の開発、国際標準化及び普及促進に関する研究」（平成 29 年度日本医療研究開発機構研究費（医薬品等規制調和・評価研究事業、代表研究者 小島肇））において、医薬部外品・化粧品の安全性評価に皮膚感作性試験代替法の活用促進を図るため、その活用事例を解説するとともに、留意点等を取りまとめたガイダンスを別添のとおり作成されたので、貴管下関係業者に対して周知願います。



## 医薬部外品・化粧品の安全性評価のための 複数の皮膚感作性試験代替法を組合せた評価体系に関するガイダンス

「医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請」では、当該物質の感作性を評価するために従来からモルモットを用いた皮膚感作性試験が用いられてきている<sup>1)</sup>。また、マウスを用いる局所リンパ節アッセイ (LLNA: Local Lymph Node Assay)<sup>2)</sup>が OECD テストガイドライン (TG: Test Guideline) 429 として、さらにその改良法として開発された放射性物質を用いない試験法が OECD TG 442A<sup>3)</sup>及び 442B<sup>4)</sup>として採択されている。

近年、皮膚感作の成立過程における様々な主たる事象に着目した、動物を用いない皮膚感作性試験代替法の開発が進められており、その中でも3種の皮膚感作性試験代替法が2015年及び2016年に OECD TG として採択された。すなわち、感作性物質とタンパク質との結合性を評価する DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay: OECD TG 442C)<sup>5)</sup>、感作性物質によるケラチノサイトのストレス応答を評価するケラチノサイト株レポーターアッセイ (ARE-Nrf2 luciferase test: OECD TG442D、例: KeratinoSens<sup>TM</sup>)<sup>6)</sup>及び感作性物質による樹状細胞の活性化を評価する h-CLAT (human Cell Line Activation Test: OECD TG442E)<sup>7)</sup>である。一方、これらの皮膚感作性試験代替法はそれぞれ単独では従来の動物を用いる試験法を代替することは不可能とされている<sup>8),9),10)</sup>ことから、有害性発現経路 (AOP: Adverse Outcome Pathway) に基づいた組み合わせ (IATA: Integrated Approaches to Testing and Assessment) による厳密な方法 (defined approach) が OECD においてガイダンス化された<sup>11)</sup> (以下「OECD 皮膚感作性ガイダンス」という)。

本ガイダンスは、医薬部外品・化粧品の安全性評価に皮膚感作性試験代替法の活用促進を図るため、IATA defined approach に基づいた皮膚感作性評価に関する OECD 皮膚感作性ガイダンスを参考に、OECD TG 442C、442D 及び 442E として採択されている皮膚感作性試験代替法を用いた場合の活用事例を解説するとともに、留意点等を取りまとめたものである。

### 1. IATA defined approach に基づく皮膚感作性評価

#### 1-1. 基本的な考え方

皮膚感作性は複雑な免疫系の全身反応であるため、単純化された単一の代替法で *in vivo* 皮膚感作性を評価することは困難である。IATA は、概念的枠組みとしての AOP を皮膚感作性評価に応用し、一連の皮膚感作成立過程における代表的な主な事象 (①タンパク質との結合、②ケラチノサイトの活性化、③樹状細胞の活性化、④T 細胞の活性化及び抗原特異的 T 細胞の増殖) を評価するための物理化学的性状、*in silico* モデル、構造活性相関、*in vitro* 試験、*in vivo* 試験及びヒト試験等の成績を複数組み合わせることが重要とされている<sup>12)</sup>。一方、IATA では、情報をどのように組み合わせるか等の重み付けは、ある程度専門家の判断に任されていることから、客観的評価のためには明確なルールに基づいた、defined approach が重要とされている<sup>13)</sup>。

#### 1-2 Defined approach

Defined approach は、一連の確かな情報源及びそれらを用いて行われる確立されたデータ解釈

作業から構成される客観的評価の手法である。一連の確かな情報源とは、ガイドライン化された試験法又は複数施設から論文が報告されている等、客観的に有用性及び妥当性が検証された方法又はデータを指し、例えば OECD 皮膚感作性ガイダンスに記載されているリスト<sup>6)</sup>から選択することが可能である。確立されたデータ解釈作業とは、明確なルールに基づいた組み合わせ評価手順であり、その予測性及び限界等が明確になっているものを指す。明確なルールに基づいた組み合わせ評価手順としては STS (Sequential Testing Strategy) や ITS (Integrated Testing Strategy) に基づくモデルの他、Bayesian network 等機械学習に基づくモデルも提案されており、OECD 皮膚感作性ガイダンス<sup>6)</sup>に事例研究が記載されている。ただし、申請者は、自らが選択した一連の情報源及びデータ解釈作業の妥当性を示す必要がある。

Defined approach は、以下①～⑤の項目から構成されることが必要である。

- ① 目的 (ハザード評価、リスク評価、既存化合物との同等性評価等)
- ② 選択した一連の情報源の根拠及び妥当性 (AOP に沿っているか、検証されているか、適用限界等)
- ③ 選択したデータ解釈作業の妥当性
- ④ 評価結果及び考察
- ⑤ 引用文献

本ガイダンスでは defined approach の一例として、「ボトムアップ 3 out of 3」を提案している。本アプローチで用いられる「一連の確かな情報源」には、AOP の主な事象のうち、タンパク質との結合、ケラチノサイトの活性化及び樹状細胞の活性化を対象とする OECD TG である DPRA<sup>5)</sup>、KeratinoSens<sup>TM6)</sup>及び h-CLAT<sup>7)</sup>を採用した。「確立されたデータ解釈作業」には、これら 3 試験が全て陰性であれば皮膚感作性は陰性と判断するというルールを採用し、その予測性及び限界をそれぞれ 2-3 及び 2-4 に示した。

## 2. 具体的事例：ボトムアップ 3 out of 3

### 2-1 ボトムアップ 3 out of 3 の基本的な考え方

ボトムアップ 3 out of 3 は、感作成立において必須である 3 つの主な事象 (1~3) を反映した 3 つの試験法 (DPRA<sup>5)</sup>、KeratinoSens<sup>TM6)</sup>及び h-CLAT<sup>7)</sup>) を組み合わせ、ボトムアップ方式、すなわち非感作性の正確な識別から始める評価方式で、当該物質の非感作性を判断するために用いられる。この結果から非感作性であると判断できない場合には、追加の安全性情報から、感作性を評価することもできる。なお、各試験法の概要及び判定方法に関しては、Appendix 1-1、1-2、1-3 を参照されたい。

### 2-2. ボトムアップ 3 out of 3 の判定と留意点

DPRA<sup>5)</sup>、KeratinoSens<sup>TM6)</sup>及び h-CLAT<sup>7)</sup>を実施し、3 試験全ての結果が陰性と判定された場合、当該物質の皮膚感作性は陰性と判定される。ただし、ボトムアップ 3 out of 3 は偽陽性が多いことから、1 試験でも陽性と判定された場合における最終的な感作性の判定は、追加の評価に基づき行うべきである。例えば、十分に使用実績のあることが知られている類縁物質の皮膚感作性データとの比較 (例：read across) 又は種々の追加データ (例：in silico、ヒト試験) 等から、総合的

に皮膚感作性の安全性を担保できる場合がある。

### 2-3. ボトムアップ 3 out of 3 の予測性

LLNA 及びヒト試験で共に結果を得られている 100 物質（ヒト陽性 74 品、ヒト陰性 26 品）の試験成績<sup>10</sup>を用い、ボトムアップ 3 out of 3 の予測性を解析した（詳細なデータは Appendix 2 を参照）。なお、本データセットには、各代替法の予測性の限界に相当する物質（金属化合物、難水溶性物質、プロハブテン及びプレハブテン：Appendix 1-1、1-2、1-3 を参照）が含まれる。本解析では、3 試験全ての結果が陰性と判定された場合、当該物質の皮膚感作性は陰性と判定するのに対し、1 試験でも陽性と判定された場合は、暫定的に、皮膚感作性は陽性と判定した。その結果、ヒト試験での感作性に対する感度、特異度及び一致率は、それぞれ 97%、35%及び 81%となり、LLNA の予測性（感度、特異度及び一致率は、それぞれ 92%、65%及び 85%）に比べ、特に感度の点で同等以上の結果であった（表 1）。

また、ヒト試験で感作性が認められるにもかかわらず、ボトムアップ 3 out of 3 で偽陰性となる物質は、diethylene triamine（LLNA EC3=3.28：感作強度は中等度で代謝が必要な物質）及び streptomycin sulfate（LLNA 陰性）の 2 品のみであり、各試験法の予測性限界である難水溶性物質（例：Log Kow $\geq$ 3.5）及び代謝が必要な物質を含む残り 77 品の感作性物質はすべて陽性と判定された。一方、LLNA に対するボトムアップ 3 out of 3 の感度、特異度及び一致率は、それぞれ 99%、43%及び 86%となり（表 1）、偽陰性は diethylene triamine のみであった。以上の結果から、ボトムアップ 3 out of 3 の偽陰性の懸念は極めて低いことが示唆された。

表 1 ボトムアップ 3 out of 3 の予測性

	vs human data			vs LLNA data			N
	感度	特異度	一致率	感度	特異度	一致率	
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	
LLNA	92	65	85	-	-	-	
ボトムアップ 3 out of 3	97	35	81	99	43	86	100

### 2-4. ボトムアップ 3 out of 3 の限界

各試験法で技術的に試験に適用することが困難な物質（各試験法のエンドポイントに影響を与える物質、混合物等：Appendix 1-1、1-2、1-3 を参照）では、3 試験すべての結果を取得できないことがある。その場合、他に補完できる情報がなければ、皮膚感作性の有無を判断できない。

一方、各試験法において予測性に限界があるとされる物質（難水溶性物質、プロハブテン及びプレハブテン等：Appendix 1-1、1-2、1-3 を参照）については、3 試験を組み合わせることで評価することにより、個々の試験の予測性限界によらず、LLNA と同等以上の精度で評価できることが示されている（Appendix 2 を参照）。したがって、各試験法で予測性に限界があるとされる物質であっても、類縁物質等、他の情報を考慮することで皮膚感作性の有無を判断できる場合がある。

## 2-5. ボトムアップ3 out of 3を構成する試験法の互換性

ボトムアップ3 out of 3で用いられる試験法と同様の主な事象を模した類似の試験法について、信頼性及び予測性が十分担保されている場合には、確かな情報源としてボトムアップ3 out of 3に組み込める可能性がある。ただし、当該試験法を組み込んだ新たなボトムアップ3 out of 3については、DPRA<sup>6)</sup>、KeratinoSens<sup>TM</sup><sup>6)</sup>及びh-CLAT<sup>7)</sup>から成るボトムアップ3 out of 3と同様に、予測性がLLNA等の動物試験又はヒト試験と同等以上であることの確認及び適用限界の明確化が必要である。

## 3. 本ガイダンスの拡張性

皮膚感作性評価については現在様々な代替法が開発されており、今後 defined approach の情報源として活用できる可能性がある。また、*in silico* や read across による評価についても、今後の活用が期待される。したがって、本ガイダンスは将来的に、活用可能な情報源及び評価方法等を拡張することを前提として作成されていることに留意する必要がある。

なお、国民の化粧品等による皮膚障害被害を早期に発見し最小化を図ることを目指し、化粧品等による皮膚健康障害症例報告を臨床医から収集し、関係省庁やメーカーへ情報の提供を行う SSCI-Net (Skin Safety Case Information Network : 皮膚安全性症例情報ネット) が設立されており、他の臨床情報も含めて皮膚感作性の評価に使用可能な情報源としての活用が期待される。

## 4. 引用文献

- 1) OECD (1992), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 406: Skin Sensitization. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-406-skin-sensitisation\\_9789264070660-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-406-skin-sensitisation_9789264070660-en)
- 2) OECD (2010), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 429: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-429-skin-sensitisation\\_9789264071100-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-429-skin-sensitisation_9789264071100-en)
- 3) OECD (2010), test guideline for the Testing of Chemicals No. 442A: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442a-skin-sensitization\\_9789264090972-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442a-skin-sensitization_9789264090972-en)
- 4) OECD (2010), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442b-skin-sensitization\\_9789264090996-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442b-skin-sensitization_9789264090996-en)
- 5) OECD (2015), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Paris, France: Organisation for

Economic Cooperation and Development. Available at:

[http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation\\_9789264229709-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation_9789264229709-en)

- 6) OECD (2015), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at:  
[http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442d-in-vitro-skin-sensitisation\\_9789264229822-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442d-in-vitro-skin-sensitisation_9789264229822-en)
- 7) OECD (2016), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at:  
[http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-in-vitro-skin-sensitisation\\_9789264264359-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-in-vitro-skin-sensitisation_9789264264359-en)
- 8) OECD (2016), OECD Guidance document on the reporting of defined approaches and individual information sources to be used within integrated approaches to testing and assessment (IATA) for skin sensitization. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at:  
[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2016\)29&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2016)29&doclanguage=en)
- 9) OECD (2012), The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins; ENV/JM/MONO(2012)10/PART1 and /PART2 (free article:  
[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2012\)10/part1&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)10/part1&doclanguage=en))
- 10) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015), Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol. 2:337-51.

## Appendix 1-1

### ペプチド結合性試験 (Direct Peptide Reactivity Assay : DPRA)

#### 1. 試験法の概要

##### 1-1. 原理

皮膚感作性は、ヒトでは接触皮膚炎、動物（齧歯類）では接触過敏症として知られる化学物質による毒性の一つである。OECDがまとめたAOPでは、化学物質による皮膚感作性は次の4つの主な事象から成るとされている。

- (1) 化学物質とタンパク質のシステイン残基又はリジン残基との共有結合
- (2) ケラチノサイトにおける炎症性応答及び ARE (Antioxidant/electrophile Response Element)-dependent pathway による遺伝子発現
- (3) 樹状細胞の活性化 (特異的細胞表面マーカーの発現、ケモカイン及びサイトカインの産生)
- (4) リンパ節におけるT細胞の増殖

DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay) は、上述した皮膚感作性のAOPにおける「化学物質とタンパク質のシステイン残基又はリジン残基との共有結合」に対応した動物を用いない *in chemico* 試験であり、OECD TG 442Cとして2015年に採択された。

本試験では、皮膚内のタンパク質の代わりに合成ペプチドであるシステイン含有ペプチド (Ac-RFAACAA-COOH) とリジン含有ペプチド (Ac-RFAAKAA-COOH) の2種類を使用する。化学物質と各ペプチドを混合し、反応させ、混合 24 時間後における未反応のペプチド量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離定量する。その結果を基に、化学物質の反応性を4段階 (High, Moderate, Low, No or Minimal) に分類する。

本試験の施設内及び施設間再現性はそれぞれ約 85%及び約 80%である。また、本試験の感度は80%、特異度は77%である。本試験法を医薬部外品・化粧品の安全性評価に利用するに当たっては、その特性を十分に理解した上で、他の補完し得る試験法等から得られた結果と組み合わせて評価を行う必要がある。

##### 1-2. 試験手順及び判定

###### 1-2-1. 試験手順

詳細な内容を確認する場合には、OECD TG 442C (DPRA) を参照する<sup>2)</sup>。

以下の流れに従い試験を実施する。

###### (1) ペプチド含有溶液の調製

- ① システイン含有ペプチド/リン酸緩衝溶液 (システイン含有ペプチド溶液)  
システイン含有ペプチド (Ac-RFAACAA-COOH、純度：90～95%) をリン酸緩衝液 (pH7.5) に0.667 mmol/Lの濃度で溶解する。
- ② リジン含有ペプチド/酢酸アンモニウム緩衝溶液 (リジン含有ペプチド溶液)  
リジン含有ペプチド (Ac-RFAAKAA-COOH、純度：90～95%) を酢酸アンモニウム緩衝液 (pH10.2) に0.667 mmol/Lの濃度で溶解する。

(2) 被験物質溶液等の調製

- ① 被験物質を以下のいずれかの溶媒に 100 mmol/L の濃度で溶解する（被験物質溶液）。  
【溶媒】アセトニトリル、水、アセトニトリル/水混液（1：1）、イソプロパノール、アセトン、アセトン/アセトニトリル混液（1：1）
- ② 陽性対照物質シンナムアルデヒド（CAS No：104-55-2、純度：95%以上）をアセトニトリルに100 mmol/Lの濃度で溶解する（陽性対照物質溶液）。

(3) 被験物質溶液等の適用

- ① 被験物質溶液とペプチドを混合する。
  - A. 被験物質溶液とシステイン含有ペプチド溶液を 10：1 で混合（n=3）
  - B. 被験物質溶液とリジン含有ペプチド溶液を 50：1 で混合（n=3）
- ② 陽性対照物質溶液についても被験物質溶液と同様に各ペプチド溶液と混合する。
- ③ 各混合液を 24±2 時間インキュベート（暗室、25±2.5℃）する。

(4) HPLC 分析

未反応のペプチド量を HPLC で分離定量する。

(5) ペプチド減少率の算出

未反応ペプチドのピーク面積から、以下の式によりペプチド減少率を算出する。

$$\text{ペプチド減少率} = \left\{ 1 - \left( \frac{\text{被験物質群のペプチドピーク面積}}{\text{コントロール群のペプチドピーク面積の平均値}} \right) \right\} \times 100$$

1-2-2. 試験成立条件

試験成立には、以下の条件を満たさなければならない。

- (1) システイン含有ペプチド溶液及びリジン含有ペプチド溶液を用いて、それぞれ0.0167～0.534 mmol/Lの範囲の6濃度で標準曲線の作成を行い、その相関係数が0.99より大きくなければならない。
- (2) 陽性対照であるシンナムアルデヒドの結果は、システイン含有ペプチドでは3回の繰り返しによる平均ペプチド減少率が60.8%～100%、標準偏差が14.9%より小さくなければならない。また、リジン含有ペプチドでは3回繰り返しによる平均ペプチド減少率が40.2%～69.0%、標準偏差が11.6%より小さくなければならない。
- (3) 各ペプチド含有溶液と溶媒の混合液を3種類のReference control A、B、Cとして用いる。Reference control A（n=3）は、分析前のHPLCシステム適合性の確認のためのもの、Reference control B（n=6）は分析時間中のReference controlの安定性を確認するためのもの、Reference control C（n=3）は使用された溶媒がペプチドの減少に影響しないことを確認するためのものである。Reference control A（n=3）及びC（n=3）の平均ペプチド濃度は0.50±0.05 mmol/Lでなければならない。
- (4) 被験物質とペプチド含有溶液の混合液において、繰り返しで行う分析値の標準偏差は、システイン含有ペプチド減少率では14.9%より小さく、リジン含有ペプチド減少率では11.6%より小さくなければならない。
- (5) Reference control B（n=6）及びReference control C（n=3）のペプチドピーク面積の変動



係数は15.0%より小さくなければならない。

### 1-2-3. 判定

被験物質の反応性は、測定ごとのペプチド減少率から平均値を算出し、以下の DPRA 分類予測モデル（表 2）に従って反応性を分類する<sup>3)</sup>。反応性の分類で、Low、Moderate 及び High に分類される化学物質は陽性、No or Minimal に分類される化学物質は陰性と予測する<sup>4)</sup>。なお、ペプチドと被験物質の溶出時間が重なる場合、ペプチド減少率の算出が不可能となるが、溶出時間の重なりをリジン含有ペプチドでのみ認める場合には、システイン含有ペプチドの結果から「システイン 1:10 のみの予測モデル」に従い、反応性を分類し、予測する。

表2 DPRA分類予測モデル

システイン 1:10 及びリジン 1:50 の予測モデル

システインの減少率とリジンの減少率の平均値	反応性の分類	DPRA 予測
0% ≤ 減少率の平均値 ≤ 6.38%	No or Minimal	陰性
6.38% < 減少率の平均値 ≤ 22.62%	Low	陽性
22.62% < 減少率の平均値 ≤ 42.47%	Moderate	
42.47% < 減少率の平均値 ≤ 100%	High	

システイン 1:10 のみの予測モデル

システインの減少率	反応性の分類	DPRA 予測
0% ≤ 減少率の平均値 ≤ 13.89%	No or Minimal	陰性
13.89% < 減少率の平均値 ≤ 23.09%	Low	陽性
23.09% < 減少率の平均値 ≤ 98.24%	Moderate	
98.24% < 減少率の平均値 ≤ 100%	High	

## 2. 試験実施上の留意点

### 2-1. ペプチド含有溶液の調製

システイン含有ペプチド及びリジン含有ペプチドは少なくとも 85%以上 (90~95%が望ましい) の純度の合成ペプチドを用い、被験物質との反応の直前に調製することが望ましい。純度が 95% を超えると溶解性が悪くなることもある。また、一連の試験は、同じシステイン含有ペプチド溶液及びリジン含有ペプチド溶液を用いて実施する。

### 2-2. 被験物質溶液の調製

「1-2-1. 試験手順」に記載された溶媒に限らず、ペプチドの安定性に影響を与えなければ、他の溶媒も使用可能である。ペプチドの安定性については、使用する溶媒にペプチドのみが溶解している対照溶液を測定することで確認することができる。それら溶媒を用いても被験物質が溶解しない場合、300 µL のジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し 2700 µL のアセトニトリルで希釈する。それでも溶解しない場合、1500 µL の DMSO に溶解し 1500 µL のアセトニトリルで希釈する。被験物質が完全に溶解していることを視覚的に確認する。

### 2-3. 被験物質溶液の適用

- (1) 被験物質は溶媒に完全に溶解していること。
- (2) 反応後、凝集物が発生していないことを確認する。
- (3) 被験物質溶液をペプチド含有溶液に混和した直後に濁り又は沈殿物が観察される場合は、被験物質の低い溶解性によるものであり、被験物質とペプチドの反応の程度については不明であることから、陽性結果は受け入れられるが、陰性結果については注意を要する。反応終了後、濁り、沈殿物又は相分離を生じる場合は遠心分離（100～400×g）し、沈降させてもよい。

### 2-4. HPLC 分析

- (1) 沈殿物が HPLC やカラムにつまらないようにする。（ニードルの先端がバイアルの底につかないように調整する。）
- (2) 24±2 時間反応したサンプル（被験物質、ペプチド及び緩衝液の混合液）の分析時間は、分析開始から 30 時間以内に終了する。
- (3) HPLC の推奨される条件としては以下の通り。

カラム：Zorbax SB-C18（3.5 μm、2.1 mm×100 mm）等。ガードカラムを設置する。

温度：30℃

UV検出波長：220 nm

流速：0.35 mL/分

移動相 A：0.1%（v/v）トリフルオロ酢酸水溶液

移動相 B：0.085%（v/v）トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液

- (4) 被験物質が波長 220 nm 付近に顕著な吸収を有する場合等で、ペプチドと同様の保持時間で溶出する co-elution が起こる場合、これを回避する目的で HPLC の条件を変更することが考えられる。この場合、変更後の条件がバリデートされた方法と同等であることを習熟度確認物質等を利用して確認する必要がある。

### 2-5. 判定

システイン 1：10 及びリジン 1：50 の予測モデルのシステインの減少率とリジンの減少率の平均値が 3～10%又はシステイン 1:10 のみの予測モデルのシステインの減少率が 9～17%である場合等、陰性と陽性の判定基準値に近接した結果の場合は、2 回目の試験実施を検討し、1 回目と 2 回目の結果が一致していない場合は 3 回目の試験を実施する。

### 2-6. 技術的に試験に適用することが困難な物質及び予測性に関して限界がある物質

これまでの 82 化学物質を用いた評価では、様々な化学物質の皮膚感作性の予測が可能であることが示されているが<sup>9)</sup>、以下の場合について留意する必要がある。

#### 2-6-1. 技術的に試験に適用することが困難な物質

(1) 100 mmol/L の被験物質溶液が調製できない物質

被験物質は、最終濃度 100 mmol/L で適切な溶媒に溶解する。この濃度で溶解しない被験物質は、さらに低い濃度で試験を実施することはできる。この場合、陽性の結果が得られれば、被験物質が皮膚感作性物質であると言えるが、陰性の結果では、反応性が低いと言う結論を導くことはできない。

(2) 混合物

被験物質とペプチドのモル比を決めることができないような未知又は変化しうる組成の混合物、複雑な反応生成物及び生体物質に対しては適用できない。

ただし、混合物のうち、各構成成分の分子量と割合が分かっている場合は、水以外の構成成分の割合の合計から純度が得られ、各構成成分の分子量と割合の合計を混合物の分子量として 100 mmol/L の被試験物質溶液を調製することができる。また、ポリマーについては、構成しているモノマーの分子量を考慮した分子量から調製することができる。なお、混合物とは水を除く主たる成分が 10% (w/w) 以上、80% (w/w) 未満の割合で含まれているものとする。

(3) ペプチドに対する酸化能を有する物質

ペプチド結合能はないが、ペプチドの酸化（システインの 2 量体化）を促進する被験物質は、ペプチド反応率を過大評価する可能性があり（ペプチドダイマー形成により、見かけ上ペプチドが減少したように見える）、結果として被験物質を偽陽性と予測することになる。

(4) 溶媒中での安定性が問題となる物質（例：溶媒中で加水分解）

(5) 高い疎水性の物質

(6) システインペプチド及びリジンペプチドと同じ溶出時間を有する物質

2-6-2. 予測性に関して限界がある物質

(1) 金属化合物

金属化合物は、共有結合以外の機構でタンパク質と反応することが知られているので適用できない。

(2) プロハプテン及びプレハプテン

本試験系は代謝系を有さない単純な化学反応を検出する *in chemico* 試験系であることから、プロハプテン（感作能獲得に代謝が必要な物質）は検出できない。プレハプテン（感作能獲得に自動酸化が必要な物質）については正しく検出できる場合がある。

これらについての陰性結果は他の情報と関連付けて解釈すべきである。

引用文献

- 1) OECD ENV/JM/MONO (2012) /Part1, The adverse outcome pathway for skin sensitization Initiated by covalent binding to proteins: Scientific evidence.
- 2) Kato H., Okamoto M., Yamashita K., Nakamura Y., Fukumori Y., Nakai K. and Kaneko H. (2003), Peptide binding assessment using mass spectrometry as a new screening method for skin sensitization. *J. Toxicol. Sci.* 28(1), 19-24.

- 3) OECD (2015), *In Chemico* Skin Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C.
- 4) EUROPEAN COMMISSION (2012), Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) , ECVAM Validation Study Report  
[http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/files-dpra/DPRA%20Validation%20Study%20Report.pdf](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/files-dpra/DPRA%20Validation%20Study%20Report.pdf)
- 5) Gerberick F., Vassallo J.D., Foertsch L.M., Price B. B., Chaney, J. G., Lepoittevin, J-P. (2007), Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. *Toxicol. Sci.* 97(2), 417-427.

## Appendix 1-2

### ケラチノサイト株レポーターアッセイ (ARE-Nrf2 Luciferase Test Method)

#### 1. 試験法の概要

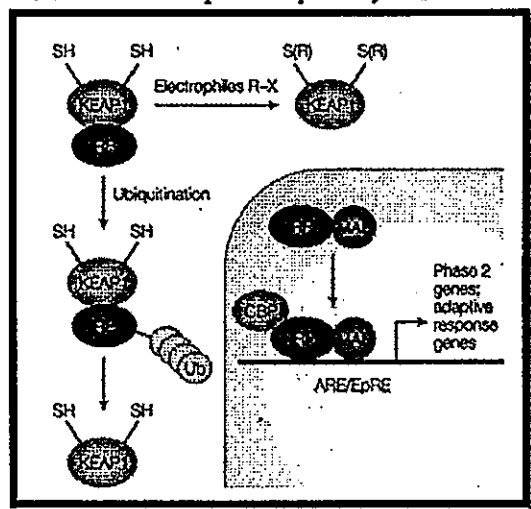
##### 1-1. 原理

皮膚感作性は、ヒトでは接触皮膚炎、動物（齧歯類）では接触過敏症として知られる化学物質による毒性の一つである。OECDがまとめたAOPでは、化学物質による皮膚感作性は次の4つの主要な事象から成るとされている。

- (1) 化学物質とタンパク質のシステイン残基又はリジン残基との共有結合
- (2) ケラチノサイトにおける炎症性応答及び ARE (Antioxidant/electrophile Response Element)-dependent pathway による遺伝子発現
- (3) 樹状細胞の活性化 (特異的細胞表面マーカーの発現、ケモカイン及びサイトカインの産生)
- (4) リンパ節におけるT細胞の増殖

ARE-Nrf2 Luciferase Test Methodは、上述した皮膚感作性のAOPにおける「ケラチノサイトにおける炎症性応答及び ARE-dependent pathwayによる遺伝子発現」に対応した動物を用いない *in vitro* 試験であり、OECD TG 442Dとして2015年に採択された。その基本的原理は Nrf2-Keap1-ARE pathway (図1<sup>2)</sup>) を利用したレポーターアッセイである<sup>3)</sup>。

図1 Nrf2-Keap1-ARE pathway の模式図



Nrf2-Keap1-ARE pathway は、転写因子 Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2)、Nrf2 の抑制因子である Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) 及び ARE が関係する遺伝子発現経路である。無刺激時、Nrf2 は Keap1 と結合し、ARE に依存して発現する遺伝子群の発現量を制御している。Keap1 のシステイン残基に求電子性の化学物質が結合すると、Nrf2 は Keap1 から解離し、核内へ移行して DNA 上の ARE に結合する。その結果、下流の遺伝子群の発現が誘導され、化学物質による障害から細胞を保護するために機能する。多くの皮膚感作性物質が Nrf2-Keap1-ARE pathway を活性化する。

本試験では、AKR1C2 遺伝子（樹状細胞において皮膚感作性物質により発現誘導される遺伝子の1つ）の ARE を融合させた SV40 プロモーターを有するルシフェラーゼ遺伝子のプラスミドを安定的に導入した HaCaT 細胞（ヒトケラチノサイト系培養細胞）を用いる。化学物質により Nrf2-Keap1-ARE pathway が活性化されるとルシフェラーゼ遺伝子が発現する。基質を添加し、ルシフェラーゼが触媒する反応の発光強度を測定することにより、化学物質の皮膚感作性を評価する。

本試験の施設内及び施設間再現性はともに約 85%である。また、2つの報告から得られている本試験法の感度は 76.7%及び 77%、特異度は 82.1%及び 79%である。本試験法を医薬部外品・化粧品等の安全性評価に利用するに当たっては、その特性を十分に理解した上で、他の補完し得る試験法等から得られた結果と組み合わせて評価を行う必要がある。

## 1-2. 試験手順及び判定

ARE 制御下のルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定的に取り込んだトランスジェニック細胞系を用いる。以下の試験手順は特に示さない限り細胞として KeratinoSens™を用いている。

### 1-2-1. 試験手順

詳細な内容を確認する場合には、OECD TG 442D (ARE-Nrf2 Luciferase Test Method) を参照する。

以下の流れに従い試験を実施する。

#### (1) 細胞の調製

1回の試験あたり 96 ウェルプレート 4 枚に細胞 (10,000 cells/well) を播種する。

#### (2) 被験物質及び対照物質の調製

被験物質を溶解させる際の溶媒は、DMSO を用いる。DMSO に不溶の場合は滅菌水又は培養液を用いて調製する。最終濃度は被験物質で 0.98~2000  $\mu\text{mol/L}$ 、陽性対照（シナムアルデヒド）で 4~64  $\mu\text{mol/L}$  となる。溶媒（陰性）対照の DMSO の最終濃度は他の調製液と同じ 1%となる。

#### (3) 被験物質等の適用

24 時間培養後、1 ウェルあたり 150  $\mu\text{L}$  の培養液と、調製した被験物質溶液等を 50  $\mu\text{L}$  ずつ加え、48 時間曝露する。

#### (4) ルシフェラーゼ活性の測定

#### (5) 細胞生存率の測定

#### (6) パラメーターの算出

測定値から以下のパラメーターを求める。

- ・被験物質及び陽性対照で観察されたルシフェラーゼ活性の最大誘導倍率： $I_{\text{max}}$
- ・ルシフェラーゼ活性誘導 (Fold induction) が溶媒（陰性）対照の 1.5 倍の閾値（ルシフェラーゼ活性が 50%増加）を超えた濃度： $EC_{1.5}$
- ・細胞生存率が 50%及び 70% (30%減) となる濃度  $IC_{50}$  及び  $IC_{30}$
- ・各  $EC_{1.5}$  値について、活性誘導が溶媒（陰性）対照に対して統計学的に有意 ( $p < 0.05$ )

であるかを検証する。

少なくとも2回の繰り返し測定を行うが、3回目を行う場合も含めて、それぞれの繰り返し測定は日を変えて行い、被験物質の溶液調製及び細胞の前培養（継代数は同じものでもよい）も繰り返し測定ごとに行う。

#### 1-2-2. 試験成立条件

以下の3条件をすべて満たす場合に成立する。

- (1) 陽性対照は陽性でなければならない。すなわち、陽性対照は少なくとも1濃度でEC<sub>1.5</sub>値であり、この値が統計学的に有意でなければならない。
- (2) 陽性対照のEC<sub>1.5</sub>値がヒストリカルデータ（7~30 μmol/Lの間のバリデーションデータに基づき定期的に更新すること）の平均の2標準偏差値以内であること及び64 μmol/Lの陽性対照の3プレートの平均のFold inductionが2~8の間にあることを確認する。後者が満たされない場合は、陽性対照によるルシフェラーゼ活性の誘導と濃度依存性の関連を慎重に確認し、濃度依存性が明らかな場合に受け入れられる。
- (3) 3プレートの6ウェルの溶媒（陰性）対照（合計18ウェル）の平均変動係数が20%未満であることが必要で、これよりも高い場合は無効とする。

#### 1-2-3. 判定

2回の繰り返し実験の2回又は3回の繰り返し実験の2回で、以下の条件により判定を行う。

- (1) I<sub>max</sub>値が1.5倍以下の誘導であれば陰性と判定
- (2) I<sub>max</sub>値が1.5倍の誘導を越えた場合でも、溶媒（陰性）対照に比較して統計学的に有意でないとき、以下のいずれかの場合には陰性と判定
  - ・1.5倍を超えるルシフェラーゼ活性の誘導を起こした最低濃度において、細胞生存率が70%以下
  - ・EC<sub>1.5</sub>値が1000 μmol/L以上（分子量未知の場合は200 μg/mL以上）  
ルシフェラーゼの誘導に明らかな濃度依存性が認められないときは結論を下せず、さらに繰り返しの実験が必要となる。

## 2. 試験実施上の留意点

### 2-1. 使用する細胞について

- (1) ARE制御下のルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定的に取り込んだトランスジェニック細胞系を用いるが、現在は試験法の開発者から直接入手可能なKeratinoSens™のみである。
- (2) ケラチノサイト由来ARE-Nrf2ルシフェラーゼレポーター遺伝子（Keratinocyte-based ARE-Nrf2 luciferase reporter gene）を用いた本試験法の細胞としてKeratinoSens™以外の細胞を用いる場合は、OECD作成のARE-Nrf2 Luciferase Test Methodに関する性能標準<sup>④</sup>に従いKeratinoSens™を用いた場合と同等以上の信頼性、正確度、感度及び特異度等を示すことを確認したのちでなければならない。
- (3) 指定された継代数の細胞を増殖させ分割して保管し、これを主ストック細胞とする。主ス

トック細胞から増殖させ、指定された継代数（KeratiNoSens™の場合は25代）以内で試験に使用する。

## 2-2. 被験物質等の適用

揮発性の高い物質を試験する場合は、蒸発及びウェル間のコンタミネーションを防ぐために、被験物質を曝露する際にはプレートをシールで覆う等の注意が必要である。

## 2-3. ルシフェラーゼの活性測定

適切なルシフェラーゼ活性の測定には、①感度の良いルミノメータ、②光の干渉による測定の妨害を防ぐのに十分なウェルの高さを持ったプレート、③十分な感度とバラつきの低い測定値を得るためのルシフェラーゼ基質の選択、が重要である。これらを確認するために引用文献 4 の Annex 3 に示されたセットアップ方法を試験前に確認することが望ましい。

## 2-4. 判定について

細胞毒性を示す濃度領域でルシフェラーゼ活性の誘導を示す物質は、わずかな濃度変化で陽性の判定が覆る例がまれにある。このような物質は、より狭い濃度範囲でより小さい希釈系列（例えば 1.33 あるいは $\sqrt{2}$ ）を用いて、誘導が細胞毒性濃度で起こるか否かを判定することが必要である。

## 2-5. 技術的に試験に適用することが困難な物質及び予測性に関して限界がある物質

Emter らが報告しているように<sup>9)</sup>、様々な構造を有する化学物質の皮膚感作性の予測が可能である。ただし、被験物質に対する本試験法の適否を判断する際には以下の点について考慮する必要がある。

### 2-5-1. 技術的に試験に適用することが困難な物質

溶媒中での安定性が問題となる物質（例：溶媒中で加水分解）

### 2-5-2. 予測性に関して限界がある物質

#### (1) 脂溶性が極めて高い物質

LogP が 7 以上の物質は、DMSO と水への溶解特性から評価が困難である。一方、LogP が 5 以下の化学物質は、水又は DMSO に可溶なため、容易に試験が可能である。

#### (2) プロハプテン及びプレハプテン

P450 による活性化が必要と推定されるプロハプテン（感作能獲得に代謝が必要な物質）は検出できない場合がある。一方、酸化反応又は酸化的脱アミノ反応を必要とする多くのプレハプテン（感作能獲得に自動酸化が必要な物質）は正しく判定できる。

#### (3) システイン残基ではなくリジン残基と反応する特徴がある物質（例：酸無水物）

システイン残基との反応が必要な Nr12 pathway を誘導しないことが推察され、偽陰性と判定されることがある。



- (4) 細胞毒性が強い物質
- (5) ルシフェラーゼ酵素に干渉する物質

引用文献

- 1) OECD ENV/JM/MONO (2012) /Part1, The adverse outcome pathway for skin sensitization Initiated by covalent binding to proteins: Scientific evidence.
- 2) Maruyama A. and Itoh K. (2005), The role of Nrf2 in the protection against inflammation and innate immunity. *Hirosaki Med. J.* 59: S167-171.
- 3) EURL ECVAM (2012), ESAC Working Group Peer Review Consensus Report on Givaudan-coordinated study transferability and reliability of the KeratinoSens assay for skin sensitisation testing.
- 4) OECD (2015), Test Guideline on an In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals TG442D.
- 5) OECD ENV/JM/MONO (2015), Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitization ARE-Nrf2 luciferase test methods in TG 442D. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N.213 OECD, Paris.
- 6) Emter R, Ellis G, Natsch A (2010), Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, 281-290.

## Appendix 1-3

### h-CLAT (human Cell Line Activation Test)

#### 1. 試験法の概要

##### 1-1. 原理

皮膚感作性は、ヒトでは接触皮膚炎、動物（齧歯類）では接触過敏症として知られる化学物質による毒性の一つである。OECDがまとめたAOPでは、化学物質による皮膚感作性は次の4つの主な事象から成るとされている。

- (1) 化学物質とタンパク質のシステイン残基又はリジン残基との共有結合
- (2) ケラチノサイトにおける炎症性応答及び ARE (Antioxidant/electrophile Response Element)-dependent pathway による遺伝子発現
- (3) 樹状細胞の活性化 (特異的細胞表面マーカーの発現、ケモカイン及びサイトカインの産生)
- (4) リンパ節におけるT細胞の増殖

h-CLAT (human Cell Line Activation Test)は、上述した皮膚感作性の AOP における「樹状細胞の活性化 (特異的細胞表面マーカーの発現、ケモカイン及びサイトカインの産生)」に対応した動物を用いない *in vitro* 試験であり、OECD TG442E として 2016 年に採択された。

皮膚感作性物質は、ランゲルハンス細胞等の樹状細胞と同様に、ヒト単球性白血病由来細胞株である THP-1 細胞の表面抗原である CD86 及び CD54 の発現を亢進させることから、本試験においては、この 2 つのマーカーを THP-1 細胞の活性化の指標として用いている。すなわち、本試験は、THP-1 細胞に被験物質を 24 時間曝露させた後に細胞表面の CD86 及び CD54 の発現変化をフローサイトメトリーで測定するという試験法である。その結果を基に、化学物質の皮膚感作性を陰性又は陽性に分類する。本試験の施設内及び施設間再現性はともに約 80% である。また、本試験の感度は 93%、特異度は 66% である。本試験法を医薬部外品・化粧品の安全性評価に利用するに当たっては、その特性を十分に理解した上で、他の補完し得る試験法等から得られた結果と組み合わせて評価を行う必要がある。

##### 1-2. 試験手順及び判定

###### 1-2-1. 試験手順

以下の流れに従い試験を実施する。

- (1) THP-1 細胞を  $0.1 \times 10^6$  cells/mL 又は  $0.2 \times 10^6$  cells/mL の密度で、それぞれ 72 時間又は 48 時間、培養フラスコを用いて前培養する。
- (2) 試験当日に新鮮な培地を用いて  $2 \times 10^6$  cell/mL に調製した THP-1 細胞を、24 ウェルプレートを用いる場合は 500  $\mu$ L ( $1 \times 10^6$  cells/ウェル)、細胞毒性試験として 96 ウェルプレートを用いる場合は 80  $\mu$ L ( $1.6 \times 10^5$  cells/ウェル) となるように播種し、被験物質を含有する等量の培地と混合する。
- (3) 適用濃度を設定するために、ヨウ化プロピジウム (PI: Propidium Iodide) を用いた 24 時間の細胞毒性試験 (PI試験) を実施し、細胞生存率が 75% と推定される濃度 (CV75) を決定

する。PI試験の実施濃度は、被験物質の溶媒における適用可能最高濃度(DMSOは1000 µg/mL、生理食塩水(若しくは培地又は他の溶媒)は5000 µg/mL)又は溶解可能最高濃度とし、公比2の希釈系列を用いて実施する。

(4) 決定したCV75を基準に、公比1.2となるよう被験物質とTHP-1細胞を $1 \times 10^6$  cells/mLで8濃度(1.2×CV75、1×CV75、1/1.2×CV75、1/1.2<sup>2</sup>×CV75、1/1.2<sup>3</sup>×CV75、1/1.2<sup>4</sup>×CV75、1/1.2<sup>5</sup>×CV75、1/1.2<sup>6</sup>×CV75)混合し、37°Cで24時間培養する。

(5) 培養細胞を回収し、Fcレセプターブロッキングをした後、THP-1細胞を3分割し、抗CD86、抗CD54及びアイソタイプコントロールの各抗体を反応させる。

使用する抗体は次のものとする。

・ Anti-CD86 antibody : BD-PharMingen、#555657 (Clone : Fun-1)

・ Anti-CD54 antibody : DAKO、#F7143 (Clone : 6.5B5)

・ FITC labeled-mouse IgG1 : DAKO、#X0927

(6) 抗体反応液を洗浄後、PI染色し、フローサイトメトリーにて生細胞1万個を測定すると共に、THP-1細胞表面に発現するCD86及びCD54抗原の発現強度を測定する。

(7) 測定した平均蛍光強度(MFI: geometric Mean Fluorescence Intensity)から、下に示す式で相対蛍光強度(RFI: Relative Fluorescence Intensity)を算出する。

RFI (%) =

$$\frac{\text{被験物質処理細胞のMFI} - \text{被験物質処理細胞のアイソタイプコントロールのMFI}}{\text{溶媒処理細胞のMFI} - \text{溶媒処理細胞のアイソタイプコントロールのMFI}} \times 100$$

#### 1-2-2. 試験成立条件

試験成立には、以下の条件を満たさなければならない。

- (1) 培地及び溶媒コントロールの細胞生存率は90%以上でなければならない。
- (2) DMSO等の溶媒コントロールにおいて、CD86及びCD54のRFIはいずれも陽性の閾値(CD86のRFIは150%以上、CD54のRFIは200%以上)を越えてはならない。
- (3) 培地及びDMSO等の溶媒コントロールにおいて、CD86及びCD54のRFIはいずれもアイソタイプコントロールのRFIの105%以上でなければならない。
- (4) 陽性対照2,4-ジニトロクロロベンゼン(DNCB)において、CD86及びCD54のRFIはいずれも陽性(CD86のRFIは150%以上、CD54のRFIは200%以上)、かつ細胞生存率は50%以上でなければならない。
- (5) 被験物質処理サンプル(1-2-1.項4)に記載の8濃度において、試験ごとに少なくとも4濃度で細胞生存率が50%以上でなければならない。

#### 1-2-3. 判定

独立した試験を少なくとも2回実施し、陰性基準以下であれば陰性と判定する。また、1回目と2回目の判定結果が不一致の場合、3回目を実施し、陰性基準以下であれば陰性と判定する。

陰性基準値 : CD86のRFI < 150%かつCD54のRFI < 200%

## 2. 試験実施上の留意点

### 2-1. 使用する細胞について

- (1) ATCC 等、十分に品質管理された細胞バンクより購入すべきである。
- (2) 培養期間中、細胞濃度は  $1 \times 10^6$  cells/mL を超えないようにする。
- (3) 細胞を起こしてから 2 週間後に、陽性対照である DNCB 及び硫酸ニッケル ( $\text{NiSO}_4$ ) により CD86 及び CD54 のいずれも陽性になり、陰性対象である乳酸により CD86 及び CD54 のいずれも陰性になることを確認しなければならない。
- (4) 細胞は起こしてから 2 か月又は継代数が 30 を超えてはならない。

### 2-2. 被験物質の調製

揮発性の高い物質を試験する場合は、蒸発及びウェル間のコンタミネーションを防ぐために、被験物質を曝露する際にはプレートをシールで覆う等の注意が必要である。

### 2-3. 陰性結果における細胞生存率

陰性の結果は、 $1.2 \times \text{CV75}$  (適用最高濃度) において細胞生存率が 90%未満である場合のみ受け入れられる。細胞生存率が 90%以上である場合は、再度、CV75 を設定し用量設定を改良することが望ましい。ただし、適用最高濃度として、DMSO では 1000 mmol/L、生理食塩水 (若しくは培地又は他の溶媒) では 5000  $\mu\text{g/mL}$  又は溶解可能最高濃度を用いる場合、細胞生存率が 90% 以上でも陰性結果は受け入れられる。

### 2-4. 技術的に試験に適用することが困難な物質及び予測性に関して限界がある物質

既知化合物の評価では、様々な化学物質の皮膚感作性の予測が可能であることが示されているが<sup>2)</sup>、本法において、被験物質は適切な溶媒に溶解又は安定的に均一に分散する必要がある。特に、以下の性質を有する化合物の場合は偽陰性になる可能性があるため試験結果の解釈には注意が必要である。

#### 2-4-1. 技術的に試験に適用することが困難な物質

- (1) 溶媒に溶解しない物質又は溶媒中で安定的に均一に分散しない物質
- (2) 強い蛍光を発する物質

多くは本試験法で評価可能である<sup>9)</sup>が、FITC と同じ波長域で強い蛍光を発する物質は、干渉のため FITC で標識した抗体を用いる評価を正しく行えない可能性がある。

#### 2-4-2. 予測性に関して限界がある物質

- (1) LogKow が 3.5 より大きい物質  
溶解性の観点から偽陰性となる可能性がある<sup>2)</sup>。
- (2) プロハプテン及びプレハプテン

本試験条件下において THP-1 細胞の代謝活性は限定的なため、プロハプテン (感作能獲得

に代謝が必要な物質) は陰性になる可能性がある。また、本試験条件下では、プレハブテン (感作能獲得に自動酸化が必要な物質) も陰性になる可能性がある。

- (3) 細胞毒性が強い物質
- (4) 揮発性物質

#### 引用文献

- 1) OECD ENV/JM/MONO (2012) /Part1, The adverse outcome pathway for skin sensitization Initiated by covalent binding to proteins: Scientific evidence.
- 2) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013), Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38:599-609.
- 3) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010), The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. *AATEX* 15:81-88.

## Appendix 2

### 100 物質のデータセット

Name	log Kow	Pre- /Prohaptent	Human Data	In vivo (LLNA)		In vitro			ホトタイプ 3 out of 3
				EC3 (% w/v)	DPR1	Keratin	Sens	ICLAT	
4-Ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one	1.51		P		0.0026	P	P	P	P
Diphenylcyclopropanone	3.25		P		0.003	P	P	P	P
Benzoyl peroxide	3.43		P		0.004	P	N	N	P
MCI/MI	-0.34/-0.83		P		0.005	P	P	P	P
p-Benzoquinone	0.25		P		0.01	P	P	P	P
Tetrachloro-salicylanilide	5.87		P		0.04	P	P	P	P
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	2.27		P		0.04	P	P	P	P
Potassium dichromate	-3.59		P		0.08	N.D.	P	P	P
Hydroquinone	1.03	pre/pro-MA	P		0.1	P	P	P	P
Glutaraldehyde	-0.18		P		0.1	P	P	P	P
1,4-Phenylenediamine	-0.39	pre/pro-MA	P		0.16	P	P	P	P
Lauryl gallate	6.21	pre/pro-MA	P		0.3	P	P	P	P
Propyl gallate	1.79	pre/pro-MA	P		0.32	P	P	P	P
2-Aminophenol	0.6	pre/pro-MA	P		0.4	P	P	P	P
2-Nitro-1,4-phenylenediamine	0.55	pre/pro-MA	P		0.4	P	P	P	P
2,5-Diaminotoluene sulfate (PTD)	0.16	pre/pro-MA	P		0.4	P	P	P	P
2-Methyl-2H-Isothiazol-3-one (MI)	-0.83		P		0.4/1.9	P	P	P	P
Methyl-2-octynoate	2.6		P		0.45	P	P	P	P
Cobalt chloride	0.85		P		0.57	P	P	P	P
Formaldehyde	0.35		P		0.7	P	P	P	P
4-(Methylamino)phenol sulfate (Metol)	2.34	pre/pro-MA	P		0.78	P	P	N.D.	P
Iodopropionyl butylcarbamate	2.45		P		0.9	P	P	P	P
1,2-Dibromo-2,4-dicyanobutane	1.63		P		0.9	P	P	P	P
2-Hydroxyethyl acrylate	-0.25		P		1.4	P	P	P	P
Glyoxal	-1.66		P		1.4	P	P	P	P
Bisphenol A-diglycidyl ether	3.84		P		1.5	P	P	P	P
2-Mercapto(benzothiazole	2.86		P		1.7	P	P	P	P
Isoeugenol	2.65	pre/pro-MA	P		1.8	P	P	N	P
Diethyl maleate	2.2		P		2.1	P	P	P	P
3-Dimethylamino propylamine	-0.45	pro/pre	P		2.2	N	P	P	P
Ethylenediamine free base	-1.62	pro/pre	P		2.2	N/P	P	P	P
1,2-Benzisothiazolin-3-one (Proxel active)	0.64		P		2.3	P	P	P	P
Methyl 2-nonynoate	3.1		P		2.5	P	P	P	P
Cinnamic aldehyde	1.82		P		3.1	P	P	P	P
Diethylenetriamine	-2.13	pro/pre	P		3.28	N	N	N	N
Phenylacetaldehyde	1.54		P		3/4.7	P	P	P	P
Benzylidene acetone (4-Phenyl-3-buten-2-one)	2.04		P		3.7	P	P	P	P
3-Propylideneephthalide	2.03		P		3.7	P	N	P	P
Farnesol	5.77	pro	P		4.1	N	P	P	P
Squaric acid	-0.44		P		4.3	P	N	N.D.	P
Citral	3.45		P		13/6.3/4.6/5.3	P	P	P	P
Nickel sulfate	-0.17		P		4.8	N.D.	P	P	P
Tetramethylthiuram disulfide	1.7		P		5.2	P	P	P	P
trans-2-Hexenal	1.58		P		5.5	P	P	P	P
3,4-Dihydrocoumarin	0.97		P		5.6	P	N	P	P
Geraniol	3.47	pro/pre	P		57/25.8/20.4/11.8/5.6	N	P	P	P
Resorcinol	1.03	pre/pro-MA	P		5.92	N	N	P	P
2-Phenylpropionaldehyde	1.96		P		6.3	P	P	P	P
1,1,3-Trimethyl-2-formylcyclohexa-2,4-diene	3.22		P		7.5	P	P	N.D.	P
Perillaldehyde	3.34		P		8.1	P	P	P	P

Name	log Kow	Pre- Pro/MA	Human final	In Vivo (LINA)		In Vivo			ボトムアップ 3 out of 3
				EC3: [9 (w/v)]		DPR4	KeratinSeas	I-CLAT	
Ethyl acrylate	1.22		P	28 / 9,7	P	P	N.D.	P	
R-Carvone	3.07		P	12.9	P	P	P	P	
Eugenol	2.73	pre/pro-MA	P	12.9	P	N/P	P	P	
Abietic acid	6.46		P	14.7	P	P	N*	P	
Lyral	3.32		P	17.1	P	P	P	P	
Phenyl benzoate	3.04		P	17.1	P	N	P	P	
p-tert-Butyl-alpha-ethyl hydrocinnamal (Lilial)	4.36		P	18.7	P	N	P	P	
Pentachlorophenol	4.74		P	20	P	N	P	P	
Cinnamyl Alcohol	1.84	pro	P	21	P	P	P	P	
Hydroxycitronellal	2.11		P	23	P	P	P	P	
Imidazolidinyl urea	-8.28		P	24	N/P	P	P	P	
Undecylenic acid	4.37		P	25	N	P	N.D.	P	
5-Methyl-2,3-hexadiene	0.06		P	25.8	P	P	P	P	
Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)	2.21		P	28	P	P	P	P	
Butyl glycidyl ether	1.08		P	28	P	P	N	P	
Penicillin G	1.85		P	30	P	N	P	P	
Aniline	1.08		P	89	N	N/P	P	P	
Methylmethacrylate	1.28		P	90	P	P/N	P	P	
Benzaldehyde	1.71		P	>25	N	P	P	P	
Benzocaine	1.8		P	>50	P	P	P	P	
Coumarin	1.51		P	>50	N	P	N	P	
Benzyl alcohol	1.08		P	NC	N	N	P	P	
Nickel chloride	0.05		P	NC	P	P/N	P	P	
Streptomycin sulfate	-11.83		P	NC	N	N	N	N	
Phthalic anhydride	2.07		N	0.16	P	N	N	P	
Hexyl salicylate	5.06		N	0.18	N	N	P	P	
Benzyl salicylate	4.31		N	2.9	N	P	N*	P	
Benzyl benzoate	3.54		N	17	N	P	N*	P	
α-iso-Methylionone	4.84		N	21.8	N	N	P	P	
d,l-Citronellol	3.56		N	43.5	P	N	P	P	
R(+)-Limonene	4.83		N	69	P	N	P	P	
Pyridine	0.8		N	72	N	N	P	P	
Diethyl phthalate	2.65		N	>100	N	N	P	P	
Propylene glycol (1,2-Propanediol)	-0.78		N	>100	N	N	N	N	
Glycerol	-1.65		N	>100	N	N	N	N	
Methyl salicylate	2.6		N	>20	N	N	N	N	
1-Butanol	0.84		N	>20	N	N	N	N	
Salicylic acid	2.24		N	>25	P/N	N	P	P	
4-Hydroxybenzoic acid	1.39		N	>25	N	N	N	N	
Fumaric acid	0.05		N	>25	P	N	N.D.	P	
Lactic acid	-0.65		N	>25	N	N	N	N	
Octanoic acid (Caprylic acid)	3.03		N	>50	N	N	P	P	
Propyl paraben	2.98		N	>50	N	P	P	P	
4-Methoxyacetophenone (Acetanisole)	1.75		N	>50	N	P	N	P	
Isopropanol	0.28		N	>50	N	N	N	N	
(±) Linalol	3.38		N	30.4 / 55	N	N	P	P	
Benzalkonium chloride	2.93		N	NC	N	N	N	N	
Sulfanilamide	-0.55		N	NC	N	N	N	N	
Glucose	-2.89		N	NC	P	N	N.D.	P	
Tween 80	0.70		N	NC	N	P	N	P	

<sup>1</sup>Calculated by KOWWIN (Ver1.68); 3.5 以上の場合、太字で表示

<sup>2</sup>MA: Michel acceptor

N: negative, P: positive, N.D.: No data, NC: not calculated

N\*: 陰性であっても、各 TG で適用限界とされている難水溶性物質の評価は難しいとされており、その扱いには注意が必要である。