

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および化粧品基準改正要請」では、化学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⁽¹⁾。また、マウスを用いる局所リンパ節アッセイ(Local Lymph Node Assay; LLNA)⁽²⁾が OECD テストガイドライン 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 テストガイドライン 442A⁽³⁾、442B⁽⁴⁾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な事象に着目した、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 年および 2016 年に OECD テストガイドラインとして採択された。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 法(Direct Peptide Reactivity Assay; OECD テストガイドライン 442C)⁽⁵⁾、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 KeratinoSens™ 法(ARE-Nrf2 luciferase test; OECD テストガイドライン 442D)⁽⁶⁾、および感作性物質による樹状細胞の活性化を評価する h-CLAT 法(human Cell Line Activation test; OECD テストガイドライン 442E)⁽⁷⁾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^{(5), (6), (7)}ことから、AOP(Adverse Outcome Pathway; 有害性発現経路)に基づいた組み合わせ(Integrated Approaches to Testing and Assessment; IATA)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⁽⁸⁾(以下「OECD ガイダンス」という)。

このような背景の下、本ガイダンスは、皮膚感作性試験代替法について、医薬部外品・化粧品の安全性評価へ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 ガイダンスを参考に、OECD テストガイドライン 442C、D および E 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わかりやすく解説するとともに、留意点などをガイダンスとして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、4. T 細胞の活性化および抗原特異的 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、ヒト試験などの成績を複数組み合わせることが重要とされている⁽⁸⁾。一方、IATA では情報をどのように組み合わせるかなどの重み付けは、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、より厳密な

方法である **defined approach** が重要とされている⁽⁸⁾。

1-2. Defined approach

Defined approach は、一連の確かな情報源と、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や複数施設から論文が出版されているなど客観的に有用性と妥当性が検証された方法やデータを指し、例えば **OECD ガイダンス** に記載されているリスト⁽⁸⁾ 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、その予測性や限界など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 **Sequential Testing Strategy(STS)** や **Integrated Testing Strategy(ITS)** に基づくモデルが比較的知られてきたが、**Bayesian network** など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**⁽⁸⁾ 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と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など)、2. 選択した一連の情報源の根拠と妥当性(AOP に沿っているか、検証されているか、適用限界など)、3. 選択したデータ解釈作業の妥当性、4. 評価結果と考察、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」が提案されている。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および樹状細胞の活性化をカバーする **OECD ガイドライン法** である **DPRA 法**⁽⁵⁾、**KeratinoSens™ 法**⁽⁶⁾ および **h-CLAT 法**⁽⁷⁾ を採用した。「確立されたデータ解釈作業」には、上記 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、その予測性と限界はそれぞれ 2・3 および 2・4 に示されている。

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 法**⁽⁵⁾、**KeratinoSens™ 法**⁽⁶⁾ および **h-CLAT 法**⁽⁷⁾)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化学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、各試験法の概要およ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

DPR法⁽⁶⁾、KeratinSensTM法⁽⁶⁾およびh-CLAT法⁽⁷⁾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、あるいは種々の追加データ(例. *in silico*、ヒト試験)などから、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 およ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⁽¹⁰⁾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、プレプロハプテン; 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、ヒトでの感作性に対する感度、特異度および一致率は、それぞれ 97%、35%および 81%となり、LLNA の予測性(感度、特異度および一致率は、それぞれ 92%、65%および 85%)に比べ、特に感度の点で同等以上の結果であった(表)。

また、ヒト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)および 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)ならびに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、特異度および一致率は、それぞれ 99%、43%および 86%となり(表)、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. 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、混合物など; 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(例. 難水溶性物質、プレプロハプテン; Appendix 2 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。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、化学物質の類似性など、他の情報を考慮することで非感作性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、信頼性およ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法⁽⁵⁾、KeratinoSensTM法⁽⁶⁾およびh-CLAT法⁽⁷⁾から成るボトムアップ3 out of 3と同様に、予測性がLLNAなどの動物試験又はヒト試験と同等以上であることの確認およ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、活用可能な情報源および評価方法など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、国民の化粧品など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など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フィードバックを行う 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

- (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
- (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
- (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
- (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
- (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
- (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

- (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⁾。

- 1) 化学物質とタンパク質のシステイン残基あるい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および Antioxidant/electrophile response element (ARE)-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、ケモカインや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。化学物質とそれぞれのペプチドを混合し、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(以下、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。

本試験の施設内および施設間再現性は約85%および約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. 試験手順および判定

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⁽²⁾。

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%)は、リン酸緩衝液(pH7.5)に0.667mMの濃度になるように溶解させる。

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%)は、酢酸アンモニウム緩

衝液(pH10.2)に0.667mMの濃度になるように溶解させる。

2) 被験物質等の調製

① 被験物質を 100mM の濃度で以下のいずれかの溶媒に溶解させる(被験物質溶液)。

【溶媒】アセトニトリル、水、アセトニトリル:水(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(1:1)

② 陽性対照物質シナナムアルデヒド(CAS No; 104-55-2、純度 \geq 95%)を、アセトニトリルに100mMの濃度で溶解させる。

3) 被験物質等の適用

① 被験物質溶液とペプチドを混合させる。

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と同様に両ペプチド溶液に混合する。

③ 各混合液を 24 \pm 2 時間インキュベート(暗室、25 \pm 2.5 $^{\circ}$ C)する。

4) HPLC 分析

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。

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(Percent peptide depletion)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およびリジン含有ペプチド溶液のそれぞれを用いて、0.0167~0.534mMの範囲の6濃度にて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) 陽性対照であるシナ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は60.8%~100%で、標準偏差は14.9%より小さく、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は40.2%~69.0%で、標準偏差は11.6%より小さくなければならない。
- 3) それぞれの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の平均ペプチド濃度は0.50 \pm 0.05mMとなり、Reference control B(n=6)およびReference control C(n=3)ではペプ

チドピーク面積の変動係数が15.0%より小さくなければならない。

- 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 C(n=3)の平均濃度は0.50±0.05mMでなければならない。

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(Percent peptide depletion)から、平均値を算出し、以下の DPRA 分類予測モデル(表 1)に従って反応性を分類する⁽³⁾。反応性の分類で、Low、Moderate および 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⁽⁴⁾。ちなみに、ペプチドと被験物質の溶出時間が重なった場合(co-elution)、ペプチド減少率(Percent peptide depletion)の算出が不可能となるが、その溶出時間の重なりが、リジン含有ペプチドでのみ認められた場合には、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1 DPRA分類予測モデル

システイン 1:10 およびリジン 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とリジン含有ペプチドの原液は少なくとも 85%以上の純度の合成ペプチドを含有し、できれば 90~95%の純度のものを用い、被験物質との反応の直前に調製することが望ましい。90~95%の純度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、同じシステインおよびリジン含有ペプチド原液を用いて実施する。なお、システイン含有ペプチドは、酸化により 2 量体化する可能性があるため、あらかじめ窒素

置換した緩衝液を用いてペプチド含有溶液を調製してもよい。

2-2. 被験物質の調製

ペプチドの安定性に影響を与えなければ、推奨溶媒以外の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。いずれの溶媒においても被験物質が溶解しない場合、300 μ L の DMSO に溶解し 2700 μ L のアセトニトリルで希釈する。それでも溶解しない場合は同じ量の被験物質を 1500 μ L の DMSO に溶解し 1500 μ L のアセトニトリルで希釈する。

2-3. 被験物質の適用

- 1) 被験物質は溶媒に完全に溶解していること。実際の試験を行う前に被験物質が適切な溶媒に溶解し、濁りや沈殿が認められないことを視覚的に確認する。
- 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、どのくらいの被験物質がペプチドと反応するかについては不明であることから、陽性結果は利用可能であろうが、陰性結果については注意を要する。反応終了後、分離が生じた場合は遠心分離(100~400 \times g)し、沈殿物を沈降させてもよい。

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) 反応サンプルの分析時間は、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 μ m、2.1mm \times 100mm)等。ガードカラムを設置する。

温度; 30 $^{\circ}$ C

UV 検出波長; 220 nm

流速; 0.35 mL/分

移動相; 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 220nm 付近に顕著な吸収を有する場合などで、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、そ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。この時、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(Proficiency substances)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 およびリジン 1:50 のペプチド減少率が 3%から 10%、またはシステイン 1:10 のみのペプチド減少率が 9%から 17%である場合など、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 回目の試験実施を検討する。

2-6. 技術的に試験に適用することが困難な物質およ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⁽⁵⁾、下記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) 100mM の被験物質溶液が調製できない場合

被験物質は、最終濃度 100mM 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、未知組成の複合混合物、未知または変化しうる組成、複合反応生成物や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わかっている場合は、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 100mM を調製することができる。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被験物質 100mM を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定義する。

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(すなわち、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およ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と反応することが知られているので、こ

これらの化合物に適用できない。

2) プロハプテンおよびプレハプテン

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
- (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

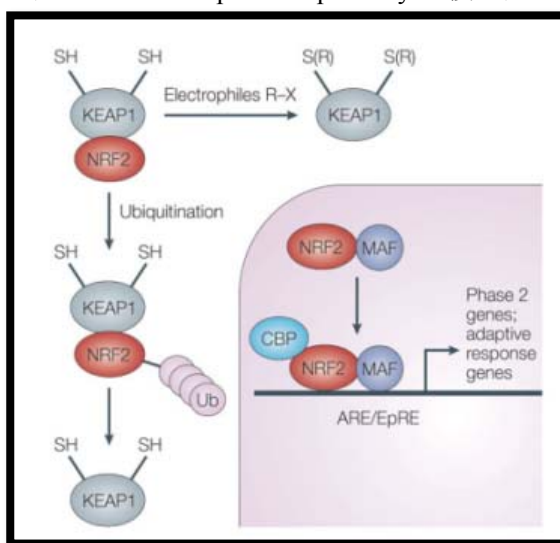
1-1. 原理

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つの主な事象から成るとされている⁽¹⁾。

- 1) 化学物質とタンパク質のシステイン残基あるい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および Antioxidant/electrophile response element (ARE)-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、ケモカインや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および ARE-dependent pathwayによる遺伝子発現」に対応し

図 1. Nrf2-Keap1-ARE pathway の模式図



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⁽²⁾)を利用したレポーターアッセイである⁽³⁾。

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)、および ARE が関係する遺伝子発現経路である。無刺激時は、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が制御されている。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。

本試験の施設内および施設間再現性は約 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%と 77%、特異度は 82.1%と 79%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. 試験手順および判定

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™ を用いた場合の記載となっている。

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⁽⁴⁾。

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(10,000cells/well)を播種する。

2) 被験物質および対照物質の調製

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あるい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 μ M、陽性対照(シナムアルデヒド)で 4~64 μ M となる。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 μ L の培養液と、調製した被験物質溶液等を 50 μ 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。

- ・ 被験物質およ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_{max}
- ・ ルシフェラーゼ活性の誘導(Fold induction)が溶媒対照の 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%および 30%減(生存率 70%)となる濃度 IC_{50} および IC_{30}
- ・ ルシフェラーゼ活性誘導が 1.5 倍を超えた各濃度について、活性誘導が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、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) 陽性対照のシンナムアルデヒドは陽性でなくてはならない。すなわち、陽性対照の誘導は少なくとも 1 濃度で 1.5 の閾値以上で統計学的に有意でなくてはならない。
- 2) シンナムアルデヒドの $EC_{1.5}$ 値はヒストリカルデータ(7 μ M と 30 μ M の間のバリデーショナル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と、64 μ M のシンナムアルデヒドの 3 プレートの平均の Fold induction は 2 から 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、シンナムアルデヒド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、あるいは 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_{max} 値が 1.5 倍以下の誘導であれば陰性と判定
- 2) I_{max} 値が 1.5 倍の誘導を越えた場合でも、溶媒対照に比較して統計学的に有意でないとき、以下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
 - ・ または、 $EC_{1.5}$ 値が 1000 μ M 以上(分子量未知の場合は 200 μ g/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Performance Standard⁽⁵⁾に従いKeratiNoSens™を用いた場合と同等以上の信頼性、正確度、感度、特異度など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、蒸発や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しールで覆うなど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を勧める。

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決め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およ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⁽⁶⁾、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 までの化学物質は、水あるいは DMSO に可溶なため、容易に試験が可能である。

2) プロハプテンおよびプレハプテン

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、酸化反応や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)を正しく判定できる。

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 Nrf2 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⁾。

- 1) 化学物質とタンパク質のシステイン残基あるい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および Antioxidant/electrophile response element (ARE)-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、ケモカインや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、ケモカインや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など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 および 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 および 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または陽性に分類する。本試験の施設内および施設間再現性は約 80%であった。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. 試験手順および判定

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 0.1×10^6 cells/mL または 0.2×10^6 cells/mL の密度で、それぞれ 72 時間、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 2×10^6 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 μ L (1×10^6 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 μ L (1.6×10^5 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(propidium iodide; PI)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%(CV75)と推定される濃度を決定する。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(生理食塩水(または培地や他の溶媒)では5000 μ g/mL、DMSOでは1000 μ g/mL)、また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で8濃度(1.2 \times CV75、1 \times CV75、1/1.2 \times CV75、1/1.2² \times CV75、1/1.2³ \times CV75、1/1.2⁴ \times CV75、1/1.2⁵ \times CV75、1/1.2⁶ \times CV75)となるよう、被験物質とTHP-1細胞を1 \times 10⁶ cells/mLで混合し、37 $^{\circ}$ 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分割して、抗CD86、抗CD54およ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およびCD54抗原の発現強度を測定する。

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

(MFI = Geometric Mean fluorescence intensity)

$$\text{RFI (\%)} = \frac{\text{被験物質処理細胞の MFI} - \text{被験物質処理細胞の isotype control の MFI}}{\text{溶媒処理細胞の MFI} - \text{溶媒処理細胞の isotype control の MFI}} \times 100$$

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) 培地およ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などの溶媒コントロールにおいて、CD86と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) 培地およびDMSOなどの溶媒コントロールにおいて、CD86とCD54のRFIはいずれもアイソタイプコントロールのその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と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、細胞生存率が50%以上でなければならない。
- 5) 被験物質処理サンプルにおいて、試験毎に少なくとも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。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 など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 1×10^6 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 および硫酸ニッケル(II)(NiSO₄)により CD86、CD54 いずれも陽性になり、陰性対象である乳酸により CD86、CD54 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 か月以上、または継代数が 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、蒸発や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など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、 $1.2 \times CV75$ (適用最高濃度)において細胞生存率が 90%未満である場合に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 を設定することで用量設定を改良することが推奨される。ただし生理食塩水(または培地や他の溶媒)では $5000 \mu\text{g/mL}$ 、DMSO では $1000 \mu\text{g/mL}$ 、または溶解可能最高濃度を適用最高濃度として用いる場合、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およ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⁽²⁾、後述する点に留意する必要がある。

本法において、被験物質は適切な溶媒に溶解あるいは安定的に均一に分散する必要がある。特に下記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また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⁽³⁾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⁽²⁾。

2) プロハプテンおよびプレハプテン

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)は陰性になるかもしれない。また、本試験条件下では、プレハプテン(感作能獲得に自動酸化が必要な物質)も陰性になるかもしれない。

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 ¹	Pre- /Prohaptent ²	Human final	<i>in vivo</i> (LLNA)	<i>In vitro</i>			ボトムアップ 3 out of 3
				EC3 [% (w/v)]	DPRa	KeratinoSens	h-CLAT	
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
Iodopropynyl 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-Mercaptobenzothiazole	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-Propylidene-phthalide	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 ¹	Pre- /Prohaptent ²	Human final	<i>in vivo</i> (LLNA)	<i>In vitro</i>			ボトムアップ 3 out of 3
				EC3 [% (w/v)]	DPRA	KeratinoSens	h-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
Lyraral	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-hexanedione	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 (Acetanisol)	1.75		N	>50	N	P	N	P
Isopropanol	0.28		N	>50	N	N	N	N
(+/-) Linalool	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

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

²MA; 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。