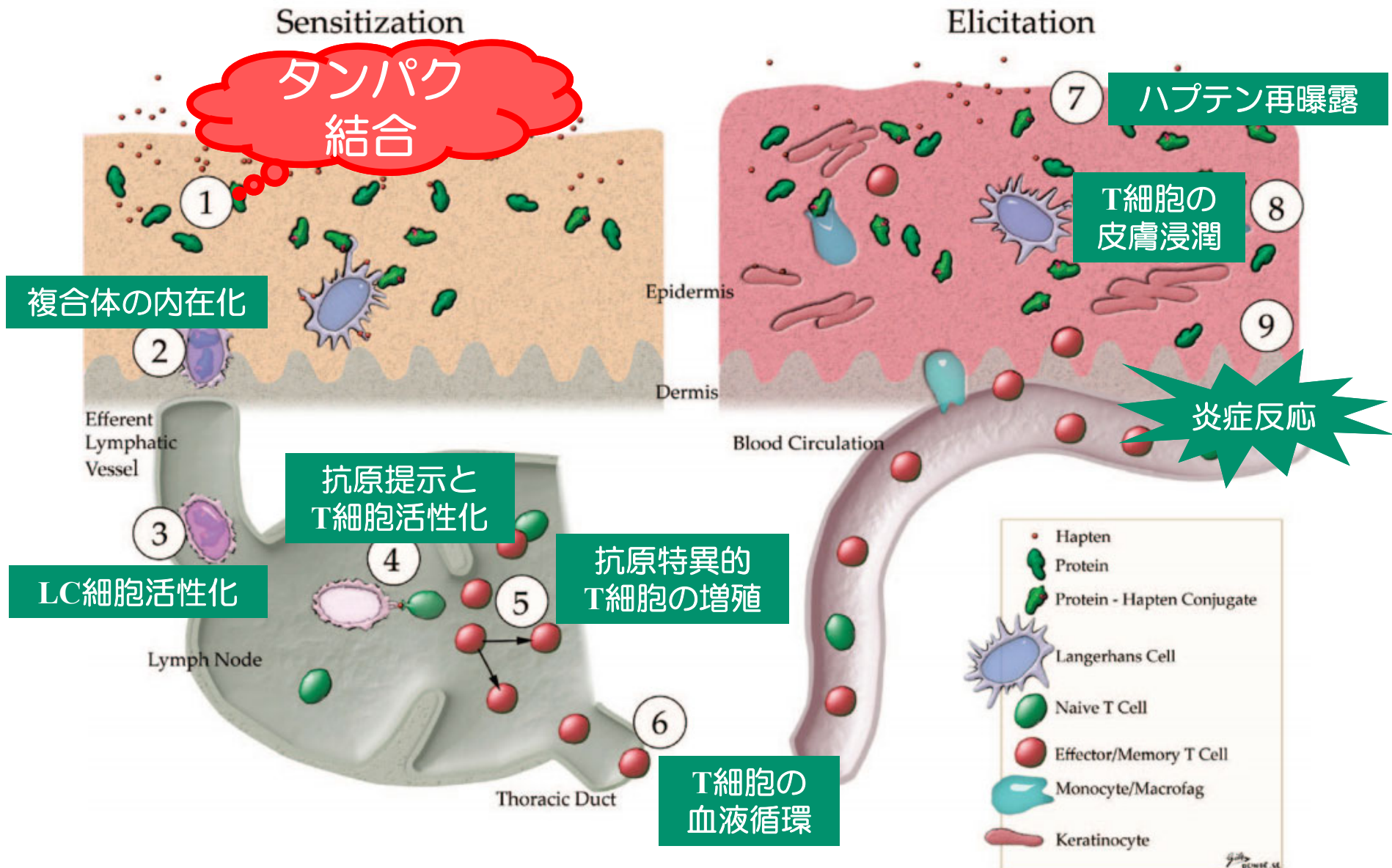


動物を用いない皮膚感作性評価法 「ADRA」の開発および OECDテストガイドライン化

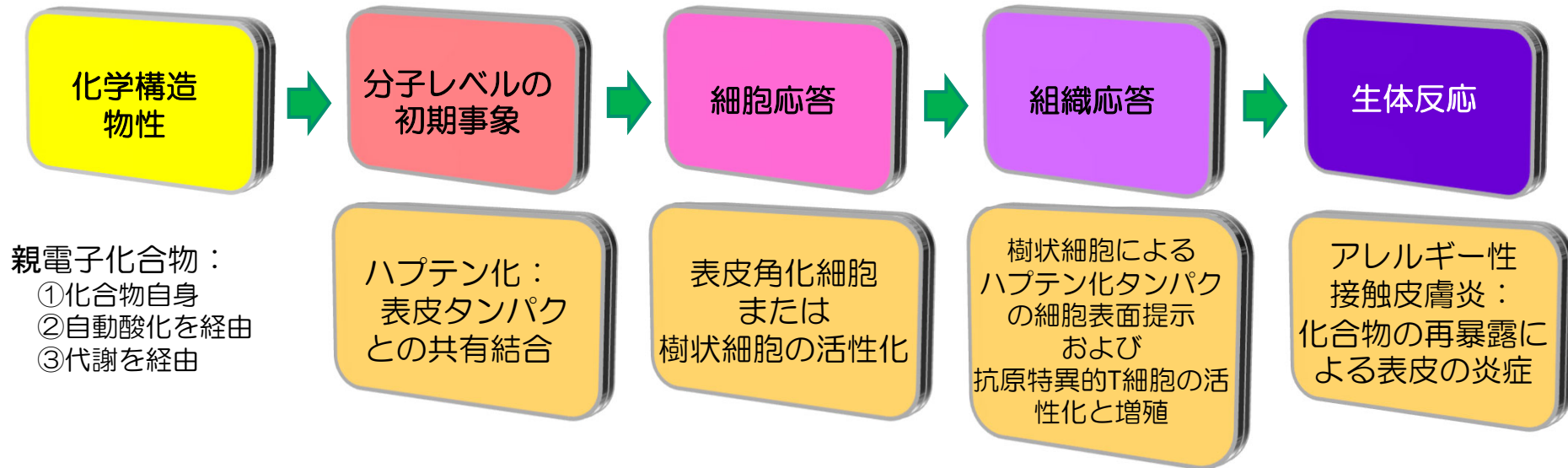
富士フイルム株式会社
ESG推進部 環境・品質マネジメント部
安全性評価センター
山本 裕介

皮膚感作性とADRAの原理

皮膚感作性発症機序



皮膚感作のメカニズムとAOP



OECDが定めた
皮膚感作AOP*

Key Event 1

Key Event 2 + 3

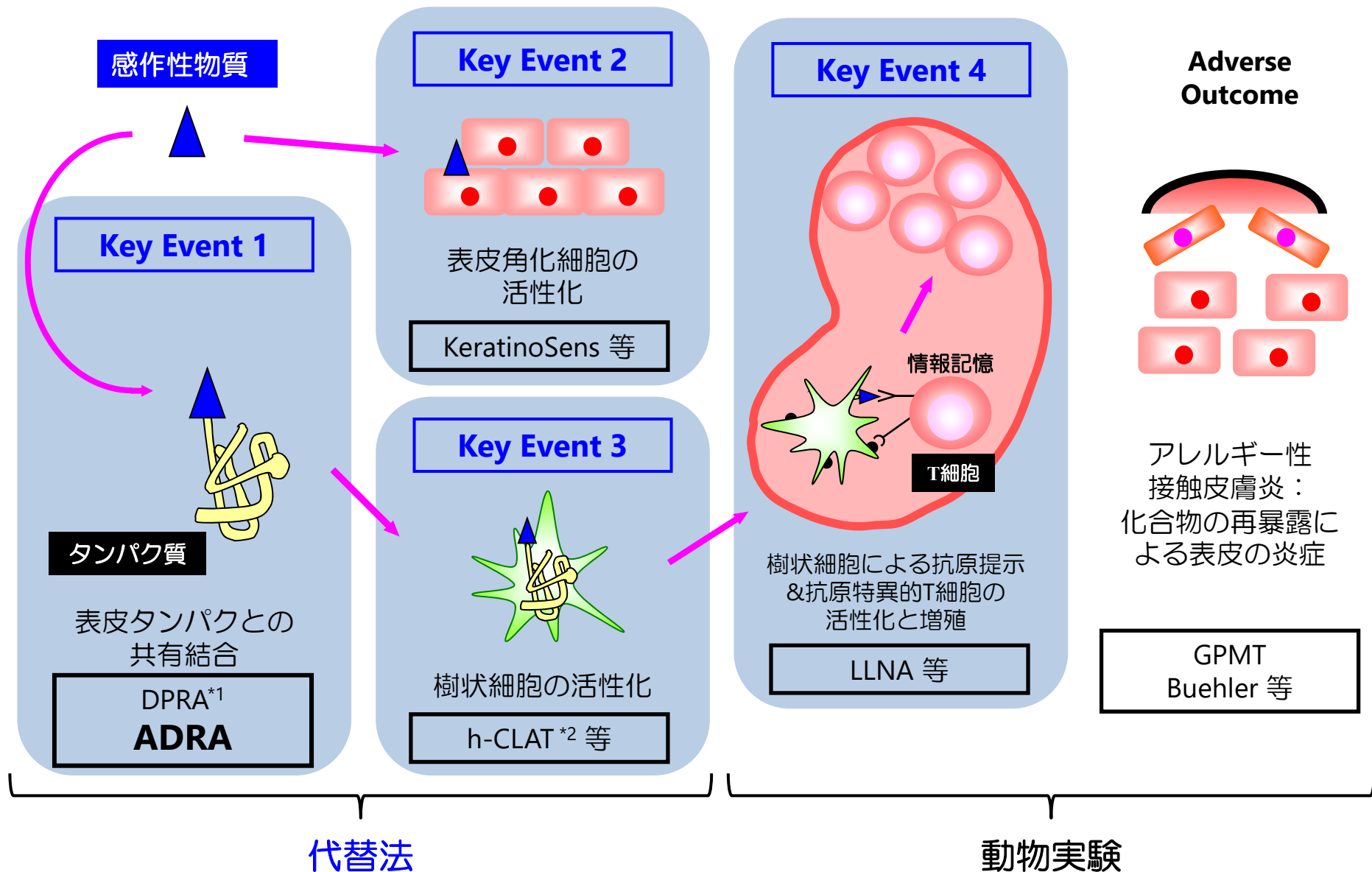
Key Event 4

Adverse Outcome

* AOP : (Adverse Outcome Pathway)

OECDが定義する種々の毒性における発現経路。
安全性試験はAOPに基づいた評価法であることが必要とされる

皮膚感作AOPと評価法



*1 Direct Peptide Reactivity Assay

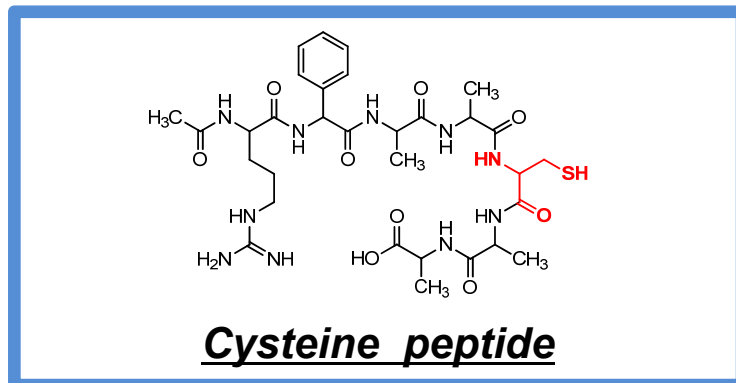
*2 human Cell Line Activation Test

既存法 (DPRA) の概要

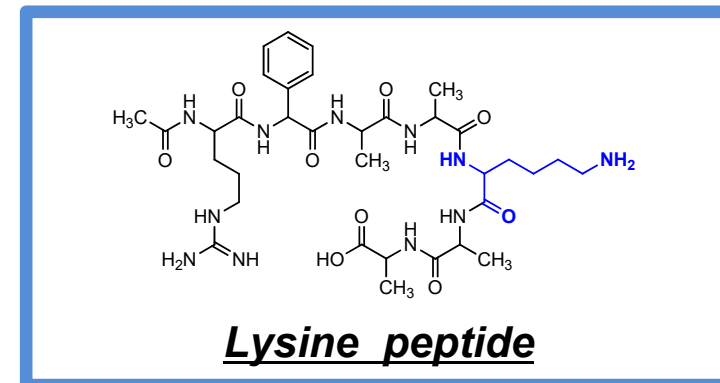
Key Event 1において、感作性物質はタンパク質中の
システイン(SH)と**リジン(NH₂)**に結合する。



システインと**リジン**を含む2種のペプチドを求核試薬 (検出試薬) として
使用し、被験物質に対する反応性を評価することで皮膚感作性を予測。



赤文字と赤線は、システインを示す。



青文字と青線は、リジンを示す。

Gerberick, et al., 2004, *Toxicol. sci.*, **81**, 332-343.

DPRAにおける課題

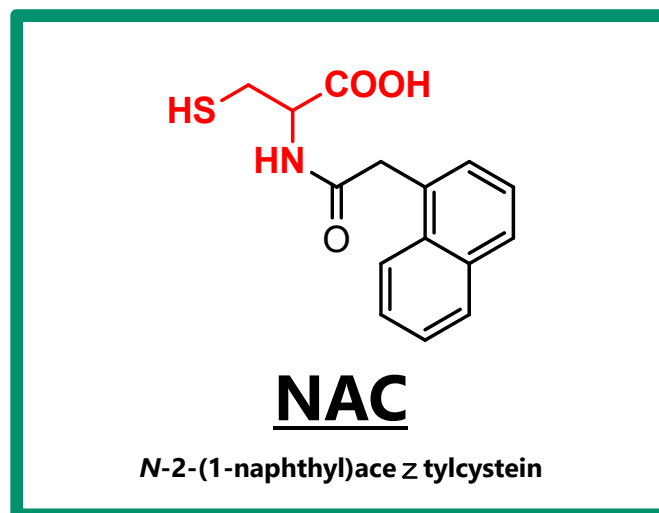
- ペプチドに特異的なUV吸収がないため、**HPLCにおける定量感度が低い。**
- 上記理由により低波長(220 nm)で検出する必要があるため、**被験物質のピークによる夾雑の影響を受けやすい。**
- 検出感度が低いため、比較的高濃度で試験する必要があり、疎水性物質などにおいて、**反応液中で析出がみられる。**

ADRAの求核試薬 (検出試薬)

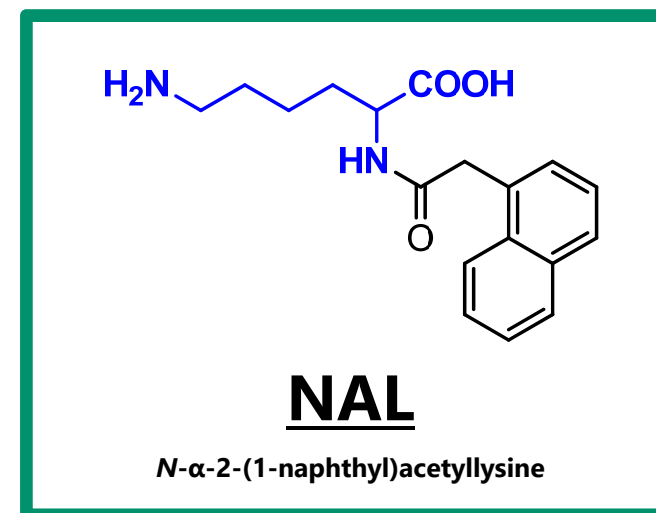
DPRAの課題である測定における定量感度を上げるために
検出部位としてナフタレン環をシステイン、リジンに
導入した求核試薬 (**NAC, NAL**) を開発



DPRAよりも高感度な測定 (1/100の求核試薬濃度) が可能



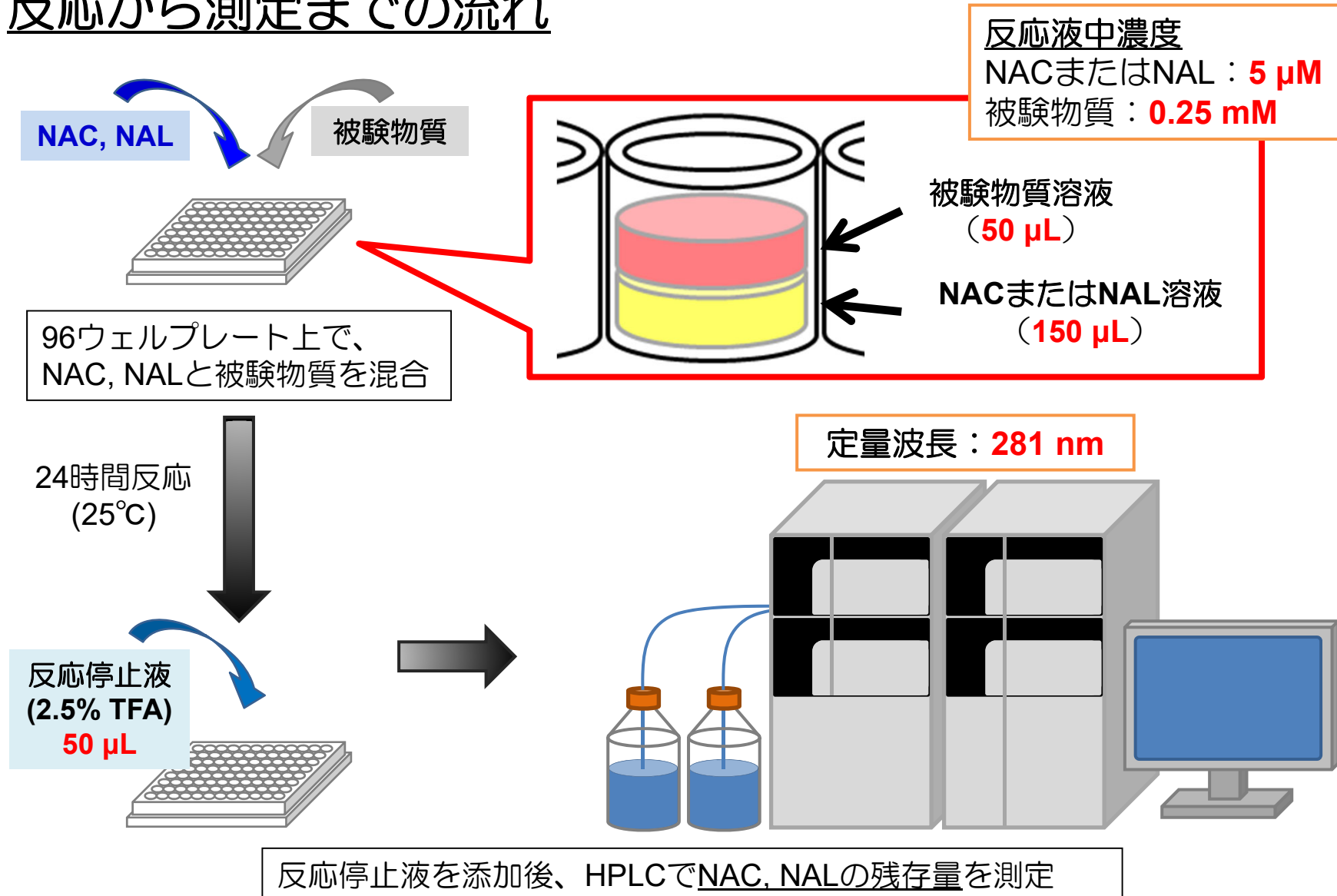
赤文字と赤線は、システインを示す。



青文字と青線は、リジンを示す。

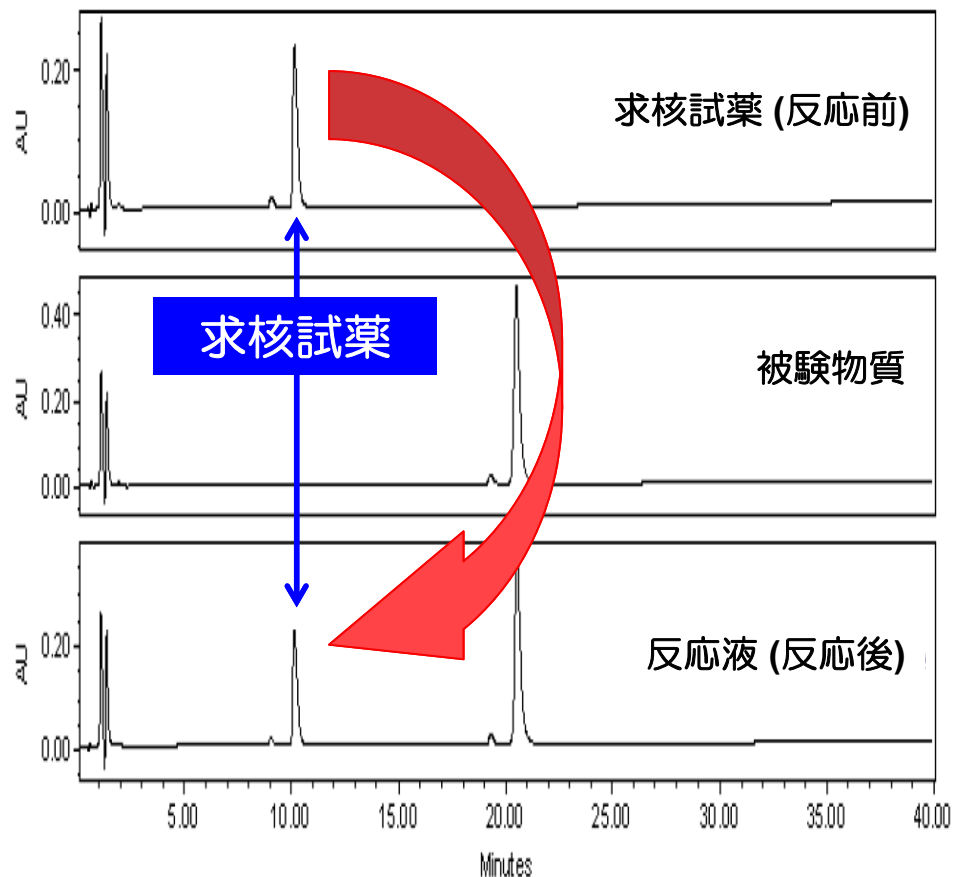
ADRAの試験概要

反応から測定までの流れ



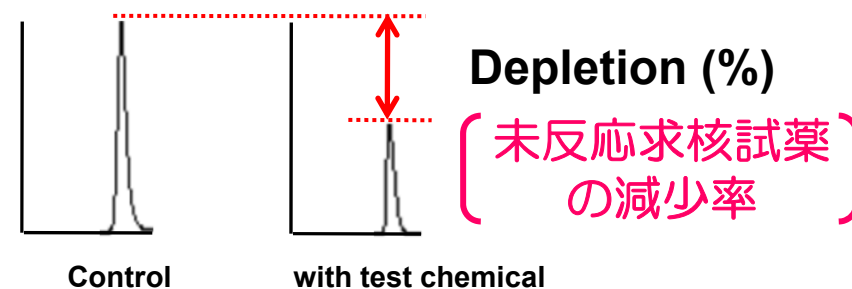
測定結果と予測モデル

HPLCクロマトグラム



未反応の求核試薬を定量

Depletionの算出



Average score (mean % depletion)

$(\text{NAC depletion} + \text{NAL depletion}) / 2$

Prediction model

<Average score>

0% ↓ 4.9% 100%

Neg

Pos

ADRAの特徴

1. 反応液中での難溶解性物質の析出 ↓

82物質における反応液中の被験物質の析出・白濁

Test substance	LogKow	LLNA		ADRA		DPRA	
		EC3 value	category	Predic.	Precip.	Predic.	Precip.
Diphenylcyclopropanone	3.25	0.0003	Extreme	P	-	P	L
Benzoyl peroxide	3.43	0.004	Extreme	P	-	P	C/L
Kathon CG	mixture	0.008	Extreme	P	-	P	C
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	-0.34	0.009	Extreme	P	-	P	C
Tetrachlorosalicylanilide	5.87	0.04	Extreme	P	-	P	C/L
2,4-Dinitrochlorobenzene	2.27	0.05	Extreme	P	-	P	C/L
Lauryl gallate	6.21	0.3	Strong	P	L	P	C/L
Nonanoyl chloride	2.97	1.8	Moderate	P	-	N	L
Methyl-2-nonynoate	3.1	2.5	Moderate	P	-	P	C/L
Cinnamaldehyde	1.82	3	Moderate	P	-	P	L
Phenylacetaldehyde	1.54	3	Moderate	P	-	P	C/L
2,4-Heptadienal	1.86	4	Moderate	P	-	P	L
2-phenylpropionaldehyde	1.96	6.3	Moderate	P	-	P	C/L
Perillaldehyde	3.34	8.1	Moderate	P	-	P	L
Palmitoyl Chloride	6.4	8.8	Moderate	P	C/L	P	C/L
1-(4-Methoxyphenyl)-1-penten-3-one	2.61	9.3	Moderate	N	-	P	L
α-Hexylcinnamaldehyde	4.82	11	Weak	N	-	N	L
α-Amylcinnamaldehyde	4.33	11	Weak	N	-	N	L
Farnesal	5.74	12	Weak	P	-	P	C/L
Benzyl benzoate	3.54	17	Weak	N	-	N	C/L
4-Allylanisole	3.47	18	Weak	P	-	P	L
Lilial	4.36	19	Weak	P	-	P	C/L
Cyclamen aldehyde	3.91	22	Weak	N	-	P	C/L
2,2,6,6-Tetramethyl-3,5-heptanedione	2.78	27	Weak	N	-	N	C/L
Ethyleneglycol dimethacrylate	2.21	28	Weak	N	-	P	L
Hexane	3.29	NC	NS	N	-	N	L
Diethyl phthalate	2.65	NC	NS	N	-	N	L
Chlorobenzene	2.64	NC	NS	N	-	N	L
1-Bromobutane	2.65	NC	NS	N	-	N	L
Isopropyl myristate	7.17	NC	NS	N	C/L	N	C/L

■ Cys/Lysのどちらか一方が白濁/析出 ; ■ Cys/Lysの両方が白濁/析出

1. 反応液中での難溶解性物質の析出 ↓

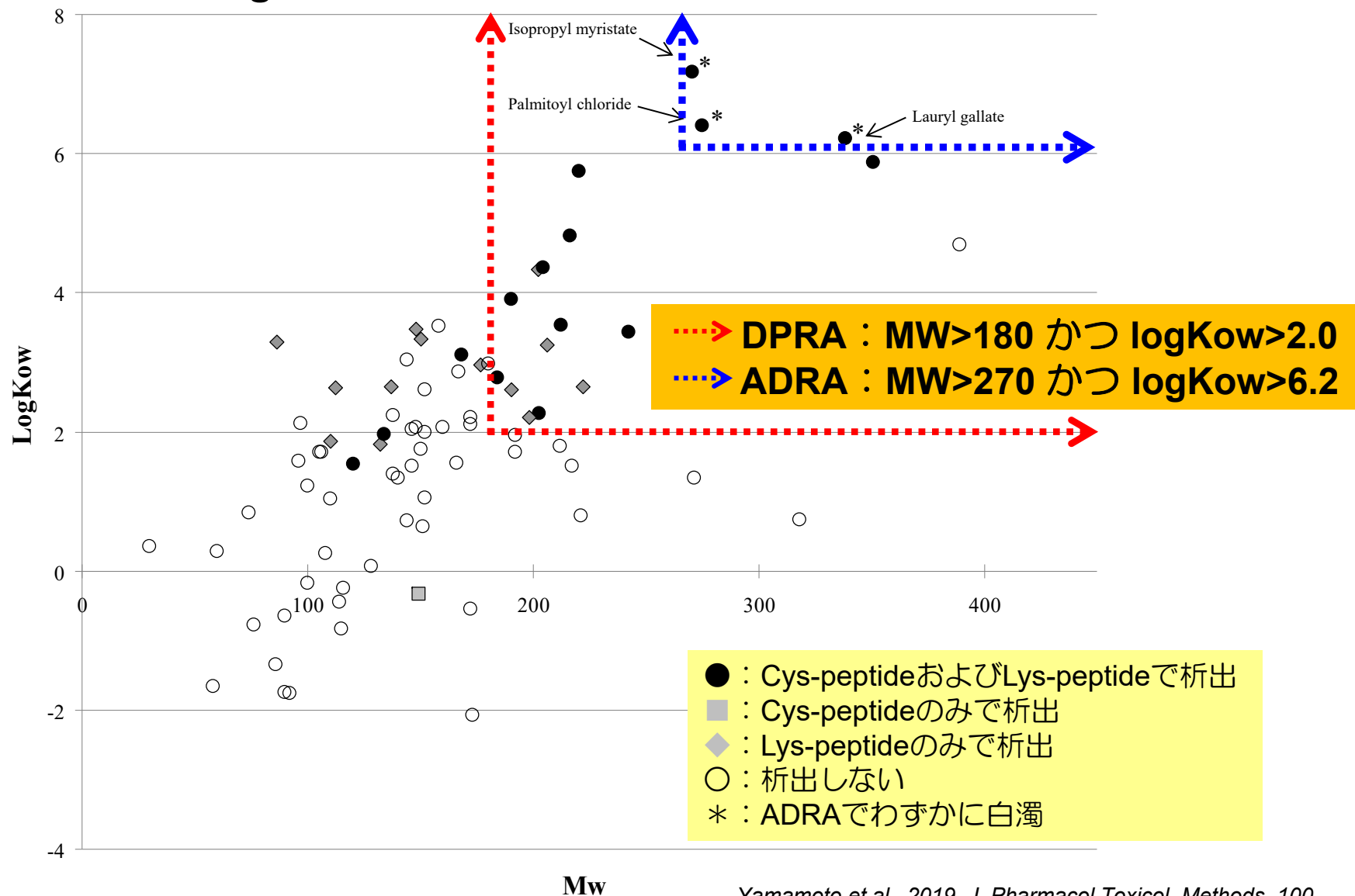
82物質中の被験物質の析出・白濁比較

Sample name	DPRA			ADRA		
	Cys-peptide	Lys-peptide	State of reaction solution	NAC	NAL	State of reaction solution
Diphenylcyclopropanone			solid precipitation			-
Benzoyl peroxide			solid precipitation			-
Tetrachlorosalicylanilide			enormous turbidity			-
2,4-Dinitrochlorobenzene			oily precipitation			-
Lauryl gallate			turbidity			slight turbidity
Sample name	DPRA			ADRA		
	Cys-peptide	Lys-peptide	State of reaction solution	NAC	NAL	State of reaction solution
Nonanoyl chloride			suspended solid			-
Palmitoyl Chloride			turbidity + suspended solid			slight turbidity
α -Hexylcinnamaldehyde			turbidity			-
Benzyl benzoate			turbidity + oily precipitation			-
Isopropyl myristate			turbidity			slight turbidity

Yamamoto et al., 2019, J. Pharmacol. Toxicol. Methods, 100

1. 反応液中での難溶解性物質の析出 ↓

82物質でのlogKow/MWと白濁/析出の相関



2. HPLC測定における共溶出 ↓

HPLC条件と共溶出の関係（DPRAとの比較）

要因	DPRA	ADRA	望ましい条件 < DPRA >	望ましい条件 < ADRA >
検出波長	220nm	281nm	可能な限り長波長	
注入試料中の被験物質濃度	25000μM	200μM	数10-数100μM	
注入試料の組成	H ₂ O : 75% ACN : 25% TFA : 0%	H ₂ O : 75% ACN : 25% TFA : 0.5%	溶離液組成と同じ <Cys-peptide> H ₂ O : 90% ACN : 10% TFA : ~0.1%	溶離液組成と同じ <NAC> H ₂ O : 70% ACN : 30% TFA : 0.1%

ADRAはDPRAと比較して被験物質濃度が低く、検出波長が長波長であるため、被験物質の夾雑ピークの影響を受けにくいと考えられる。

2. HPLC測定における共溶出 ↓

DPRAとADRAの共溶出比較

Test chemicals	LLNA category <i>in vivo</i> test	ADRA		DPRA <i>Data reported in the papers</i>	
		NAC	NAL	Cysteine peptide	Lysine peptide
<i>p</i> -Benzoquinone	Extreme ¹⁾	N	N	N ¹⁾	co-elution ^{R,1)}
Kathon CG	Extreme ¹⁾	N	N	N ¹⁾	co-elution ^{P,I,1)}
<i>p</i> -Phenylenediamine	Strong ¹⁾	N	N	co-elution ^{R,1)}	co-elution ^{R,1)}
Maleic anhydride	Strong ²⁾	N	N	N ²⁾	co-elution ²⁾
Propyl gallate	Strong ²⁾	N	N	N ²⁾	co-elution ²⁾
Chloramine T	Strong ¹⁾	N	N	N ¹⁾	co-elution ^{P,R,1)}
Cobalt (II) chloride	Strong ²⁾	N	N	N ²⁾	co-elution ²⁾
1,2-Dibromo-2,4-dicyanobutane	Strong ²⁾	N	N	N ²⁾	co-elution ²⁾
2-Mercaptobenzothiazol	Moderate ¹⁾	N	N	N ¹⁾	co-elution ^{P,1)}
Benzyl salicylate	Moderate ²⁾	N	N	N ²⁾	co-elution ²⁾
1-Thioglycerol	Moderate ¹⁾	N	N	co-elution ^{R,I,1)}	co-elution ^{P,R,I,1)}
Dihydroeugenol	Moderate ¹⁾	N	N	N ¹⁾	co-elution ^{R,1)}
5-Methyl-2-phenyl-4 <i>H</i> -pyrazol-3-one	Moderate ²⁾	N	N	N ²⁾	co-elution ²⁾
Phenyl benzoate	Weak ²⁾	N	N	N ²⁾	co-elution ²⁾
<i>N</i> -Butyl glycidyl ether	Weak ²⁾	N	N	N ²⁾	co-elution ²⁾
Aniline	Weak ²⁾	N	N	N ²⁾	co-elution ²⁾
Methyl methacrylate	Weak ¹⁾	N	N	co-elution ^{R,1)}	co-elution ^{R,1)}
Benzyl alcohol	Non-sensitizer ²⁾	N	N	N ²⁾	co-elution ²⁾
Salicylic acid	Non-sensitizer ³⁾	N	N	N ³⁾	co-elution ³⁾
Dimethyl isophthalate	Non-sensitizer ¹⁾	N	N	N ¹⁾	co-elution ^{P,I,1)}

1) EURL ECVAM DPRA Validation Study Report, 2012, 2) Takenouchi, et al., 2015, 3) Gerberick, et al., 2007, 4) Basketter, et al., 2007

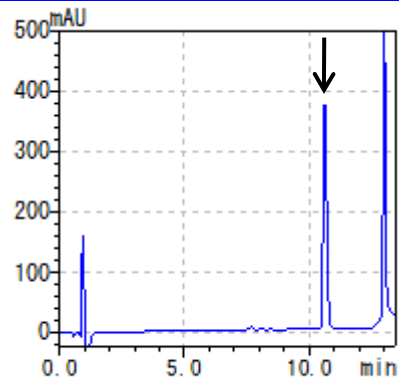
· "P", "R", and "I" indicate the data obtained from P&G, Ricerca, and IVMU (In-Vitro Methods Units/ ECVAM) in DPRA Validation study report (2012), respectively.

· "co-elute" indicates that test chemicals did co-elute with cysteine peptide or lysine peptide (pink cells), "N" indicates that test chemicals did not co-elute with cysteine peptide or lysine peptide.

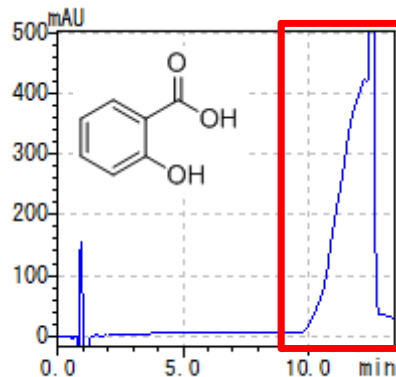
2. HPLC測定における共溶出 ↓

共溶出時のクロマトグラム：DPRAとADRAの比較

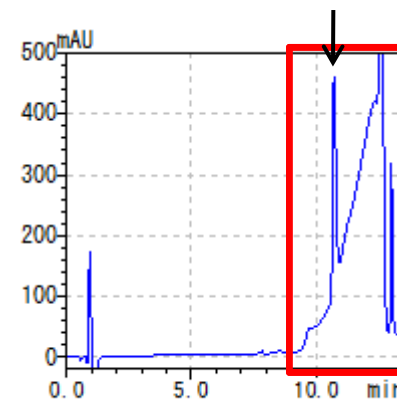
DPRA - 220nm -



Lys-peptide

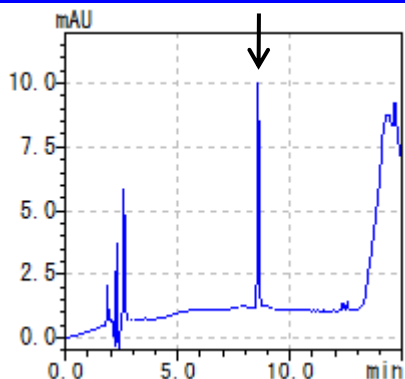


Salicylic acid

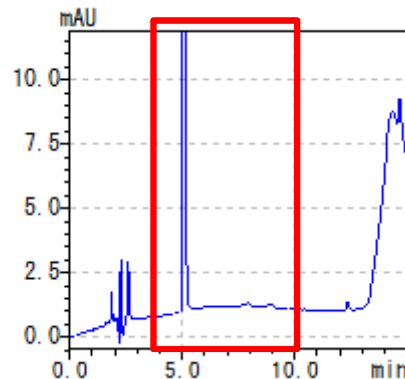


Lys-peptide + Salicylic acid

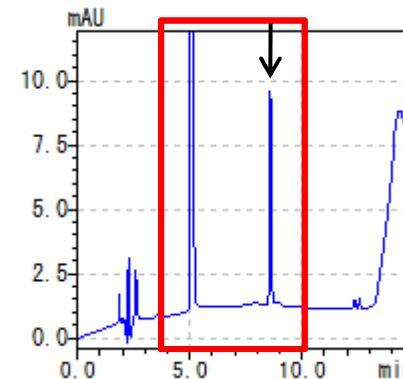
ADRA - 281nm -



NAL



Salicylic acid



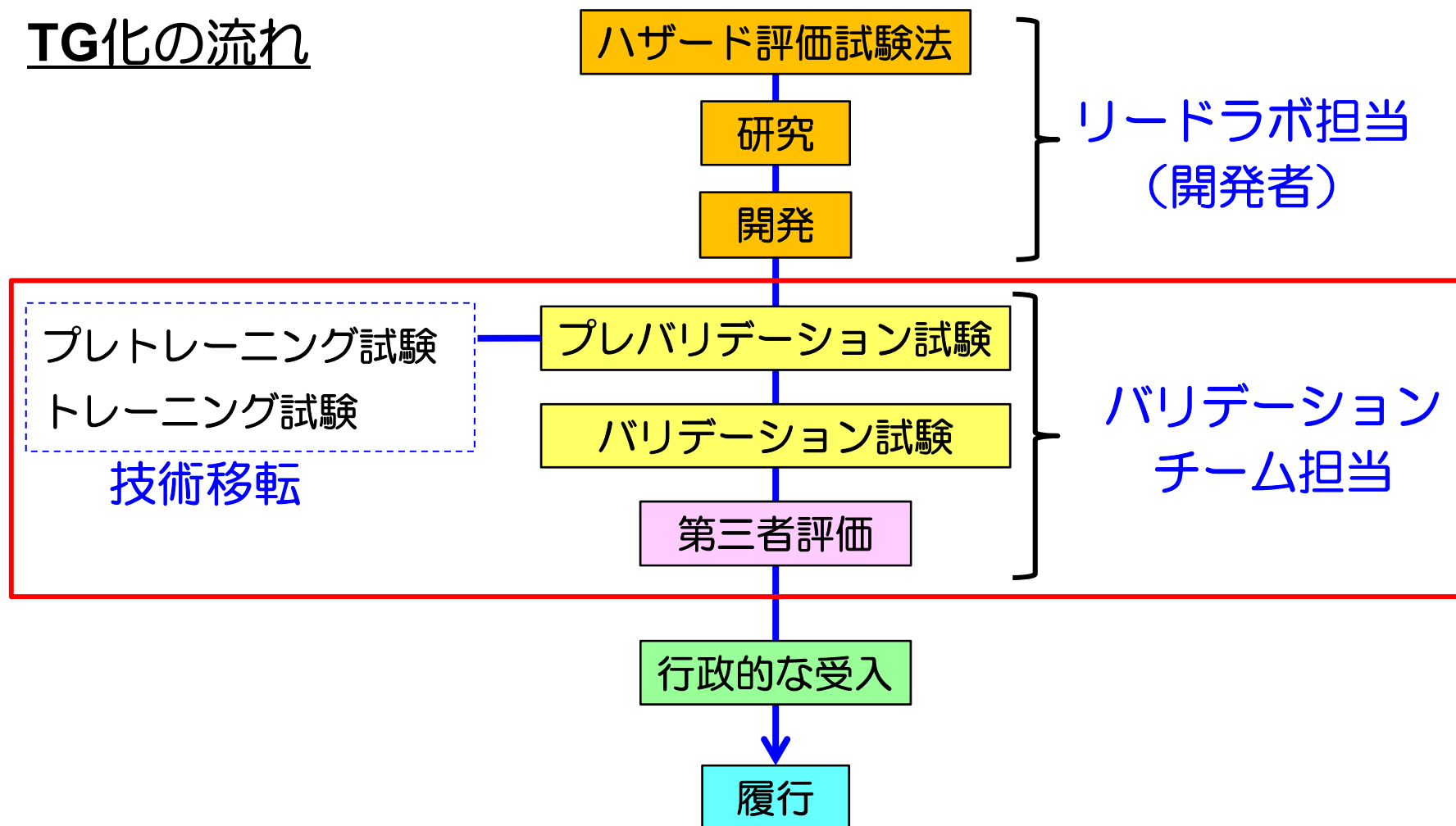
NAL + Salicylic acid

ADRAのOECDテストガイドライン化

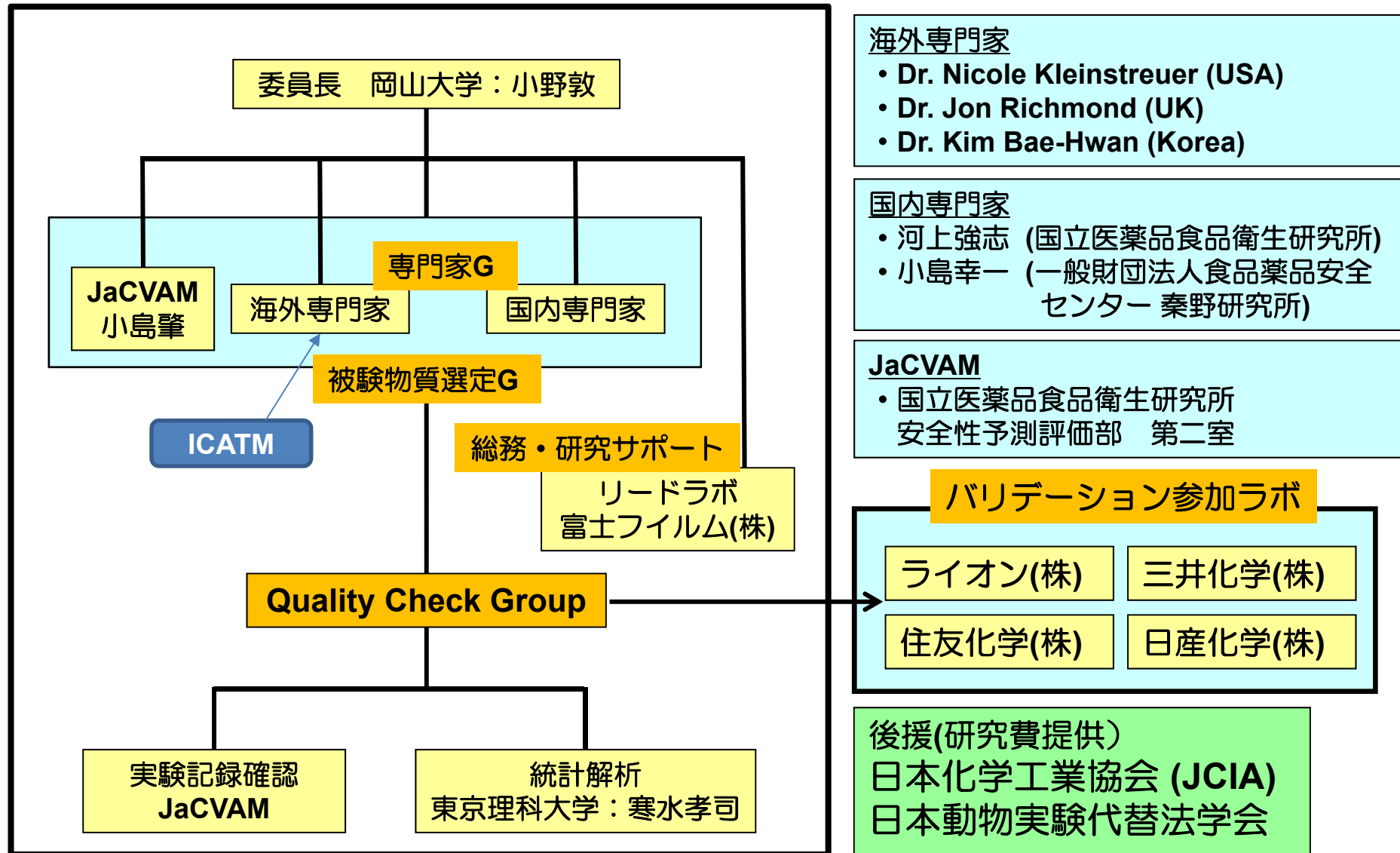
OECDテストガイドライン化までの流れ

OECD GD34：試験法のOECDテストガイドライン (TG) 収載
に関するガイダンス
⇒このガイダンスに従いTG化が進められる

TG化の流れ



ADRA バリデーション試験 組織体制



バリデーション実行委員会 (VMT)

JaCVAM：日本動物実験代替法評価センター
VMT：Validation Management Team

バリデーション試験の概要と結果

バリデーション試験とは

試験法の妥当性を検証するための試験。コード化された化合物を用いて主に3施設以上の参加施設により施設内再現性、施設間再現性の2種の再現性確認を行う。

ADRAにおけるバリデーション試験

全40物質について4施設で試験を実施。

施設内再現性

10物質×3回の試験を実施し、各施設内再現性を算出

施設間再現性

上記 + 30物質×1回の試験結果から、計40物質における施設間再現性を算出

結果

施設内 再現性

ADRA (10物質) = 90-100% (全体 : 97.3% [=36/37])

DPRA (15物質) = 86.7% (84.6%)*

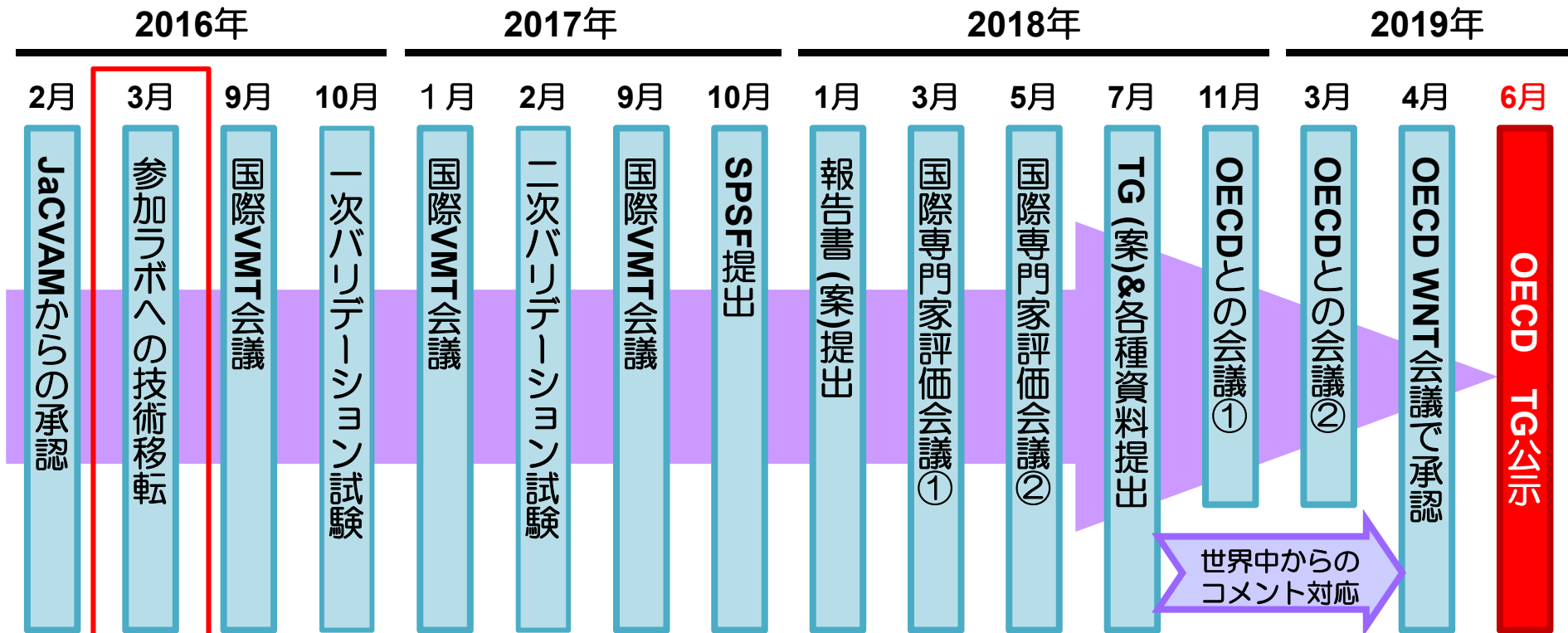
施設間 再現性

ADRA (40物質) = 91.9%

DPRA (24物質) = 75.0% (81.8%)*

* () 内は、適用範囲外の2物質を除いた値

ADRAのガイドライン化まで



JaCVAM : 日本動物実験代替法評価センター
 VMT : Validation Management Team
 SPSF : Standard Project Submission Form
 TG : Test guideline
 WNT : The Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Programme

再現性の高い結果 → 専門家から高評価

3年4ヶ月でテストガイドラインに収載

ADRAの利用範囲を広げるための取組み

1. 重量濃度法による分子量不明成分の評価

ADRAやDPRAの試験条件では求核試薬と被験物質の、モル比が一定となるように調製した反応液で試験を行う。



被験物質の分子量が分からないと評価することができない。

反応液中のモル比
(NAC/NALまたはペプチド：被験物質)

ADRA法	DPRA法	
NAC/NAL	Cys-peptide	Lys-peptide
1:50	1:10	1:50

化粧品原料は分子量が不明なものや混合物が多い

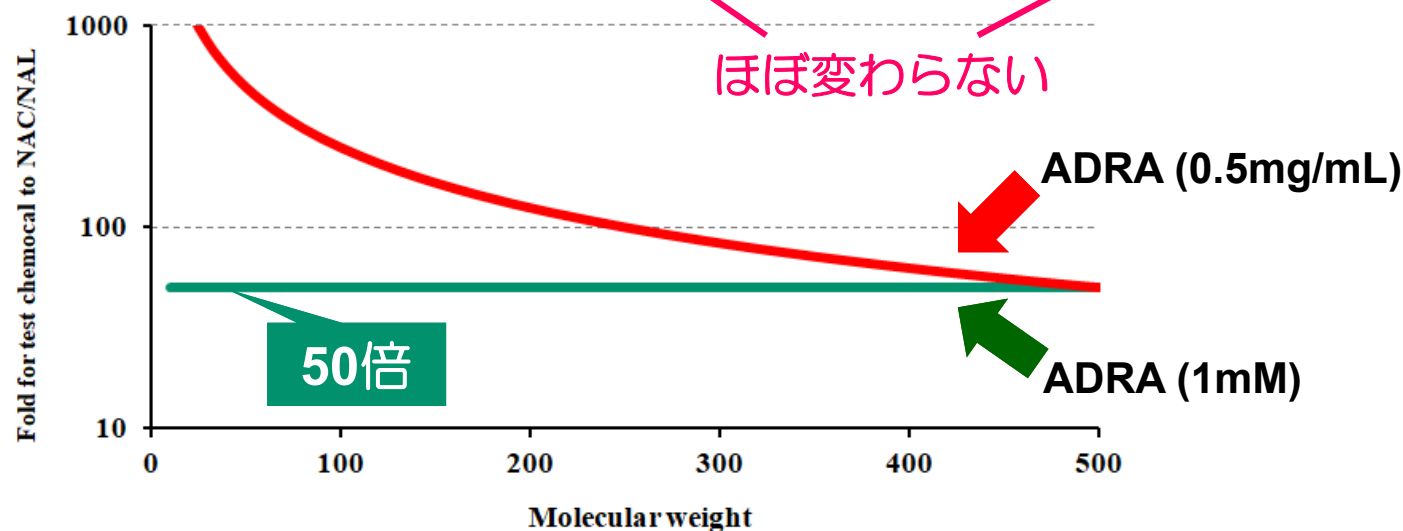


分子量情報を必要としない試験法として、**重量濃度 (w/v)** で調製した被験物質溶液を用いた試験系を開発

1. 重量濃度法による分子量不明成分の評価



A ≪ B であれば、速度定数 k は、 $[C_A]$ に依存し、 $[C_B]$ には依存しない。



1. 重量濃度法による分子量不明成分の評価

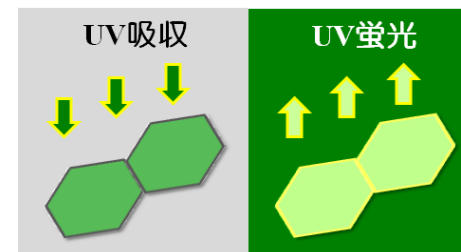
重量濃度法とモル濃度法（従来法）の予測精度比較

		0.5 mg/ml			1 mM		
		<i>Predicted classification</i>			<i>Predicted classification</i>		
<i>Chemical Classification</i> ^a		S	NS	total	S	NS	total
		S	47	6	53	43	10
NS	4	25	29	1	28	29	
total	51	31	82	44	38	82	
sensitivity:		88.7%		sensitivity:		81.1%	
specificity:		86.2%		specificity:		96.6%	
positive predictivity:		92.2%		positive predictivity:		97.7%	
negative predictivity:		80.6%		negative predictivity:		73.7%	
accuracy:		<u>87.8%</u>		accuracy:		<u>86.6%</u>	

^aBased primarily on LLNA data

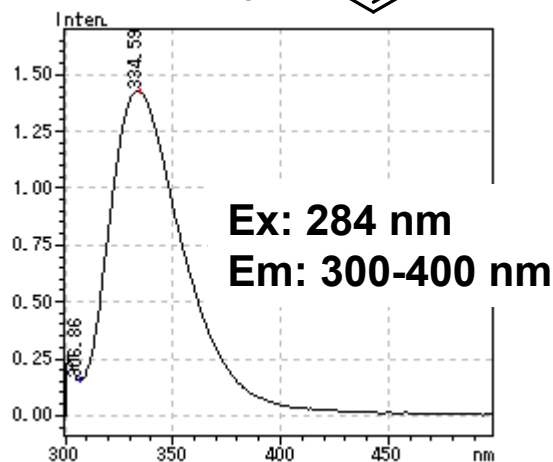
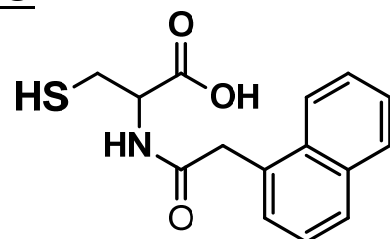
2. 蛍光測定法

NAC, NALに含まれるナフタレン環は蛍光を持つため、
蛍光検出による、より選択的な測定が可能

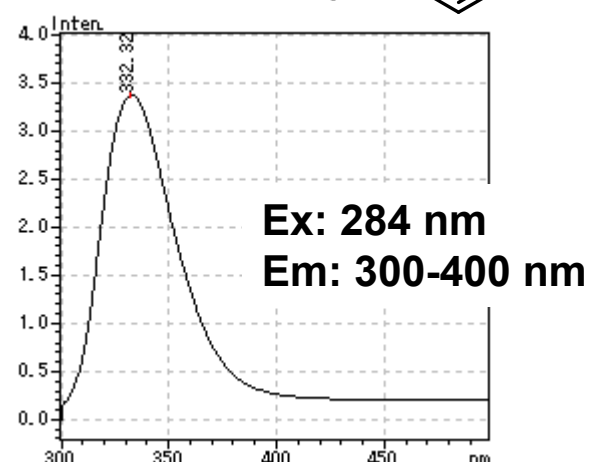
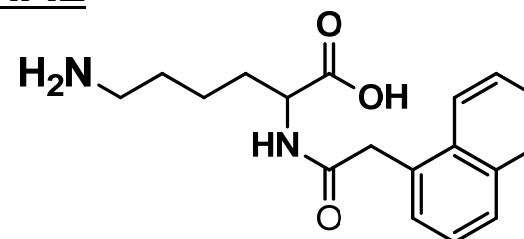


NAC, NALの蛍光スペクトル

NAC

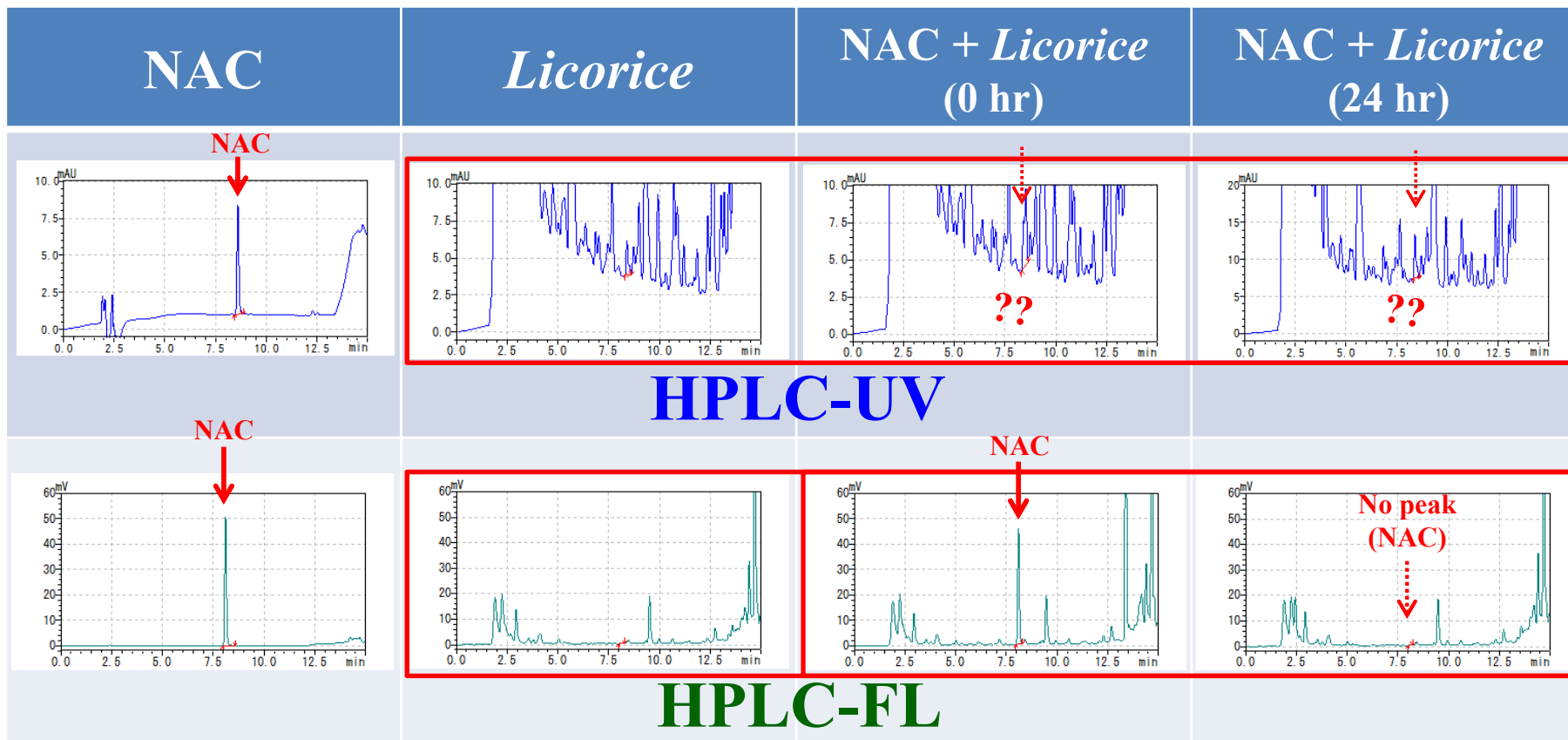


NAL



2. 蛍光測定法

Licorice (甘草) 抽出液とNACの反応における検出方法の比較



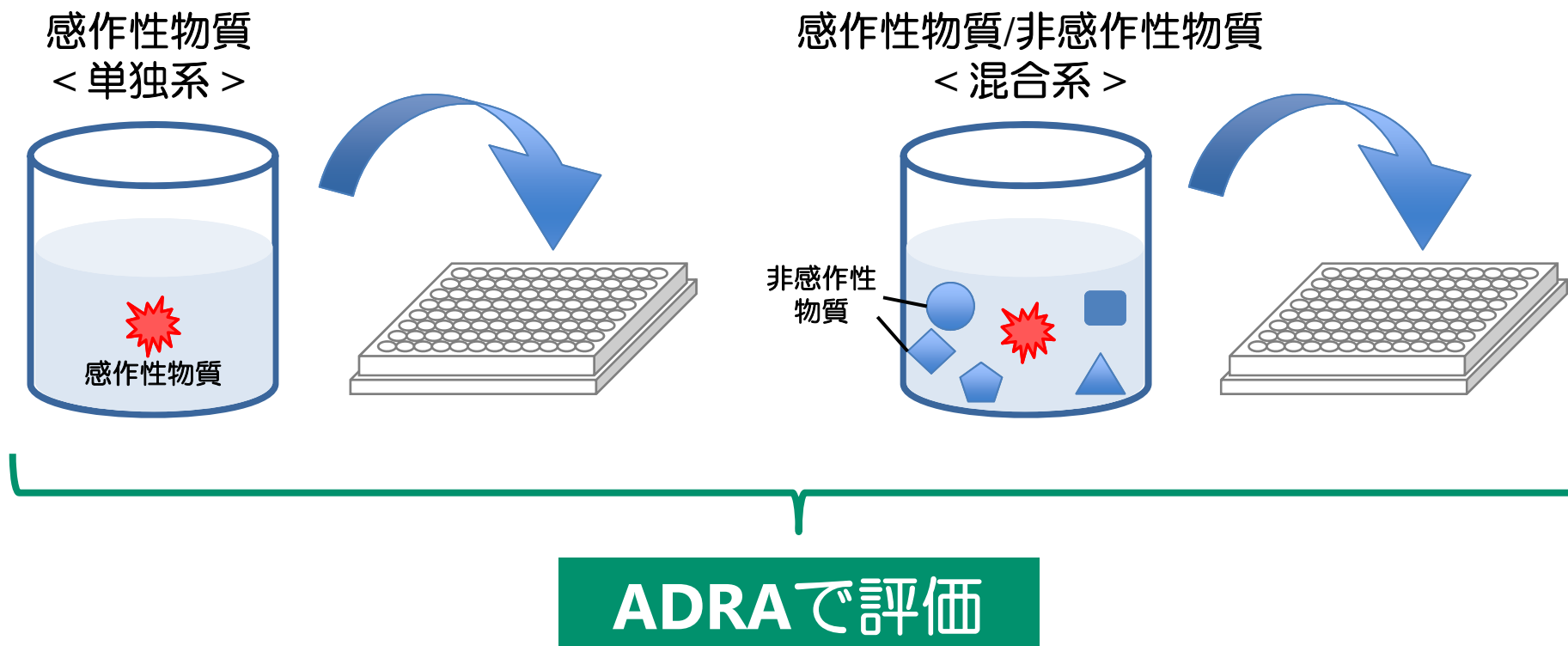
Fujita et al., 2019, *Toxicol. In Vitro*, 59, 161-178.

3. 混合物の評価（重量濃度法と蛍光法の組合せ）

混合物評価における課題

1. 被験物質の分子量情報がない → 重量濃度法で評価可能
2. 被験物質の夾雑ピークが多い → 蛍光検出で夾雑ピークを回避

重量濃度法による疑似混合液評価



3. 混合物の評価（重量濃度法と蛍光法の組合せ）

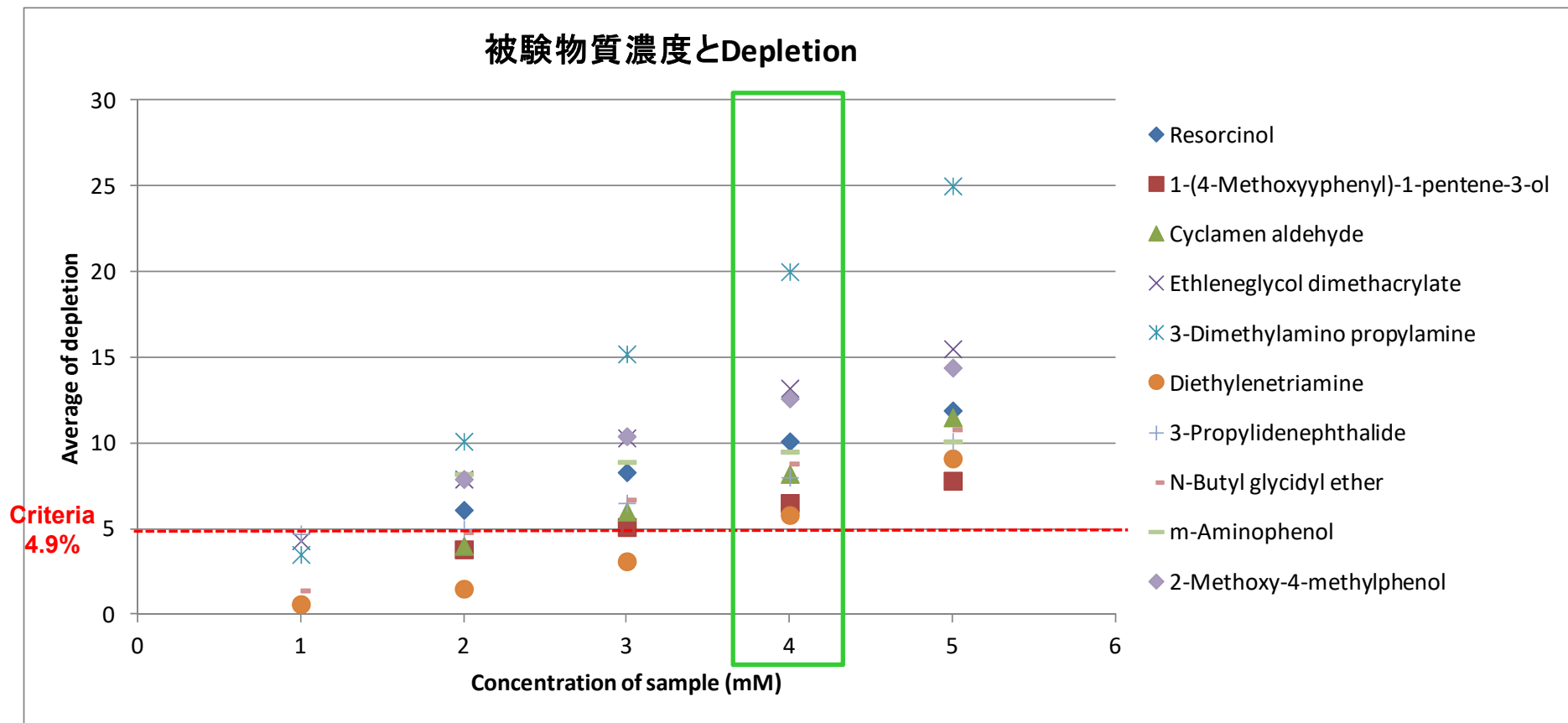
重量濃度法による疑似混合液評価

№	Test substance	EC3 value	LLNA category	0.5 mg/ml	
				Sensitizer + Mixture	Sensitizer only
1	p-Benzoquinone	0.0099	Extreme	S (100)	S (94.1)
2	Glutaraldehyde	0.1	Strong	S (46.7)	S (55.2)
3	Phthalic anhydride	0.16	Strong	S (50.9)	S (52.6)
4	2-Mercaptobenzothiazole	1.7	Moderate	S (52.6)	S (53.4)
5	Nonanoyl chloride	1.8	Moderate	S (5.0)	S (37.7)
6	Phenylacetaldehyde	3	Moderate	S (65.0)	S (59.1)
7	Perillaldehyde	8.1	Moderate	S (34.4)	S (49.6)
8	2,3-Butanedione	11	Weak	S (54.2)	S (64.8)
9	Farnesal	12	Weak	S (18.3)	S (14.7)
10	5-Methyl-2,3-hexanedione	26	Weak	S (7.8)	S (42.7)

感作性物質単体と同様に疑似混合液中に含まれる感作性物質も検出可能

4. 被験物質濃度の最適化

現在の被験物質濃度 (1mM) よりも高い濃度で試験を実施することで、クライテリア付近の偽陰性化合物を正しく評価できることが判明。



Imamura et al., 2021, J. Appl. Toxicol., 41. 303-329.

4mMの被験物質濃度が最適であると判断

4. 被験物質濃度の最適化

4mM被験物質濃度における予測精度 (136物質)

	ADRA		Dpra
	1mM (従来)	4mM	100mM
Accuracy (%)	72	76	75
Sensitivity (%)	65	76	72
Specificity (%)	89	79	76

Imamura et al., 2021, J. Appl. Toxicol., 41. 303-329.

被験物質濃度を1mM→4mMとすることで予測精度が向上

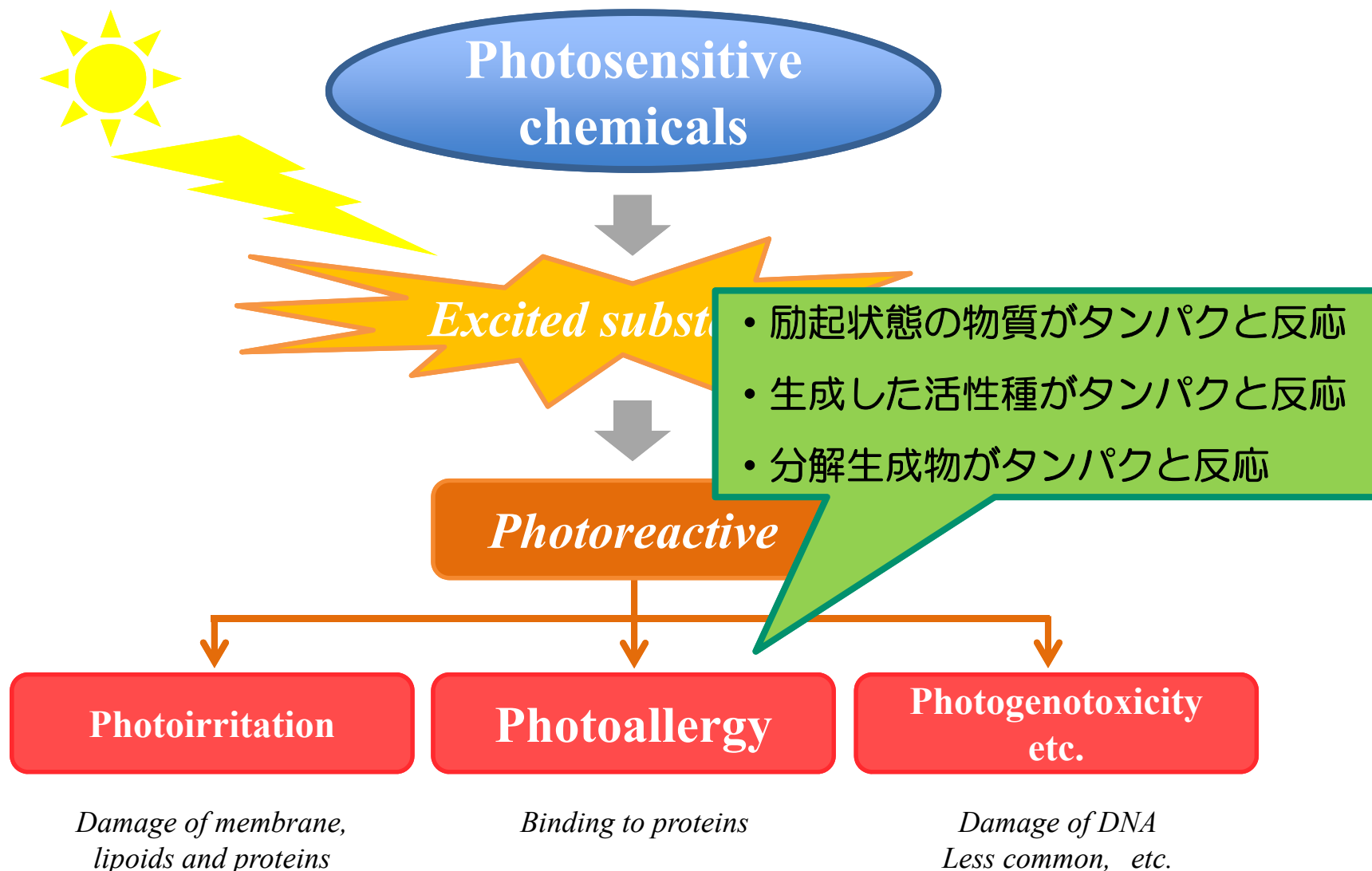
- 4mMの被験物質濃度
- 混合物の評価条件

ガイドライン改訂申請中

他の毒性評価への**ADRA**の応用

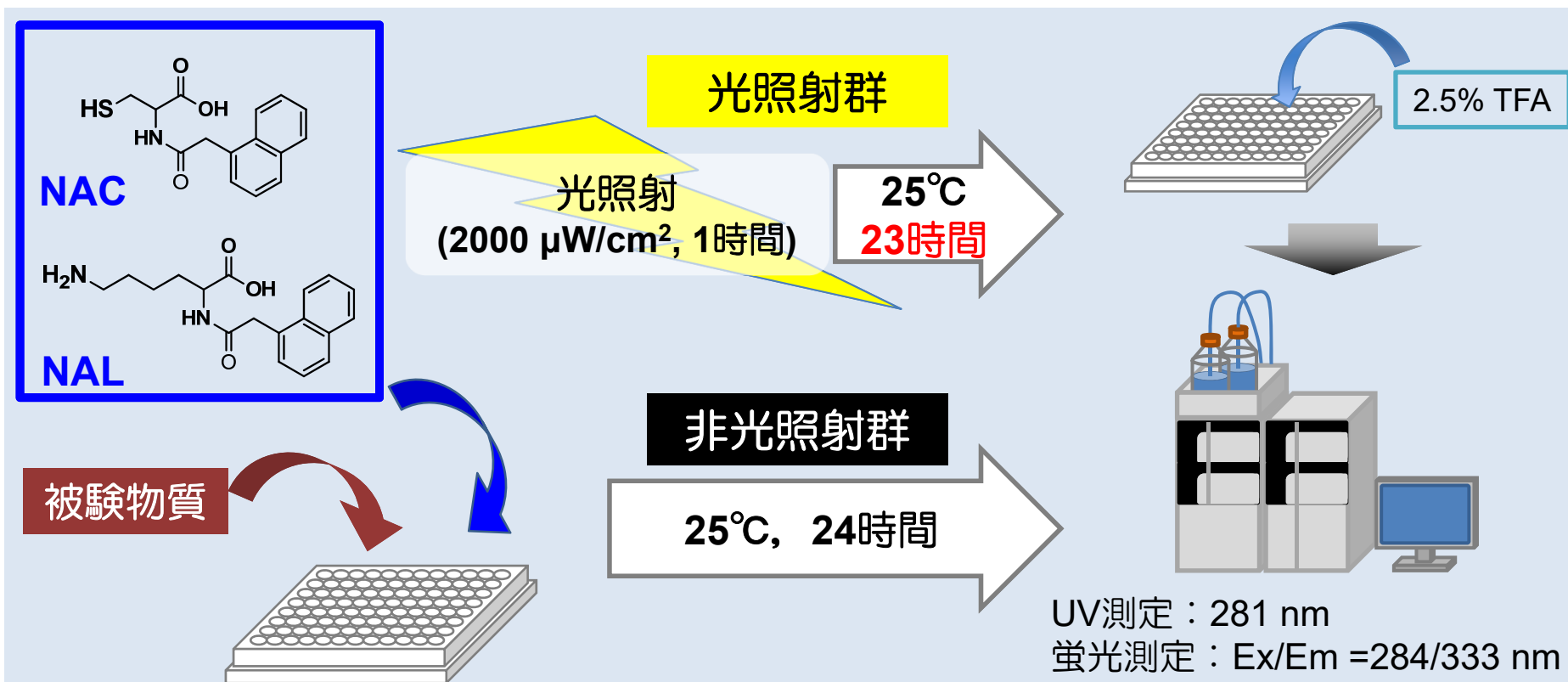
1. ADRAを用いた光アレルギー評価法

光化学反応と光アレルギー



1. ADRAを用いた光アレルギー評価法

Photo-ADRA - 測定手順と判定方法 -



【光アレルギーの判定方法（クライテリア）】

- 1) 光照射群と光非照射群における平均Depletionの差 $\geq 10\%$
- 2) 光照射群と光非照射群におけるNACまたはNALどちらかにおけるDepletionの差 $\geq 15\%$

1 または 2 のどちらかを満たす場合: **Positive**

1 および 2 のどちらも満たさない場合: **Negative**

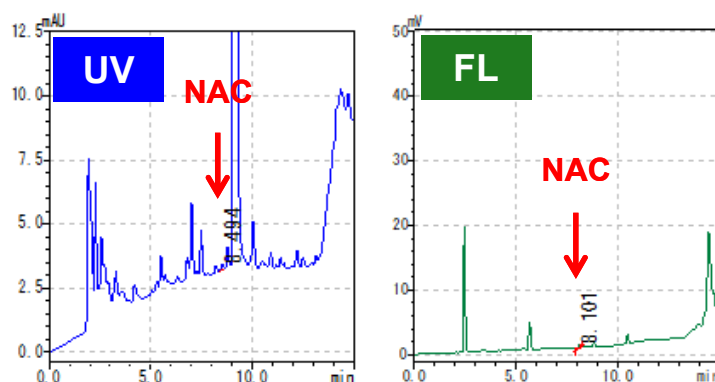
1. ADRAを用いた光アレルギー評価法

Photo-ADRAによる光アレルギー物質の評価結果

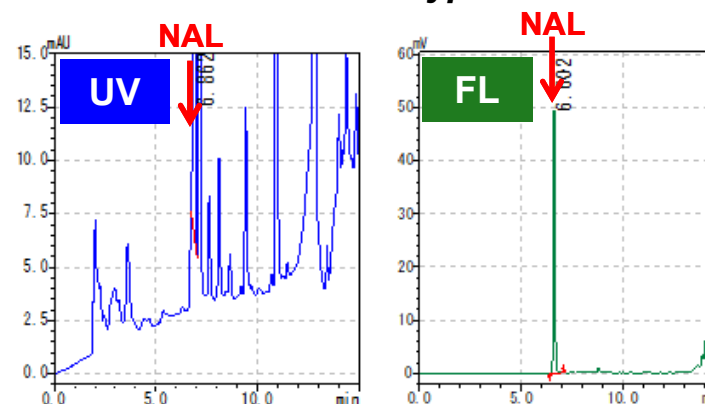
	Pos	Neg	Total
Pos	28	5	33
Neg	7	20	27
Total	35	25	60
Sensitivity : 84.8%			
Specificity : 74.1%			
Accuracy : 80.0%			

クロマトグラム の例 (8-Methoxypsoralen 光照射群)

NAC + 8-Methoxypsoralen

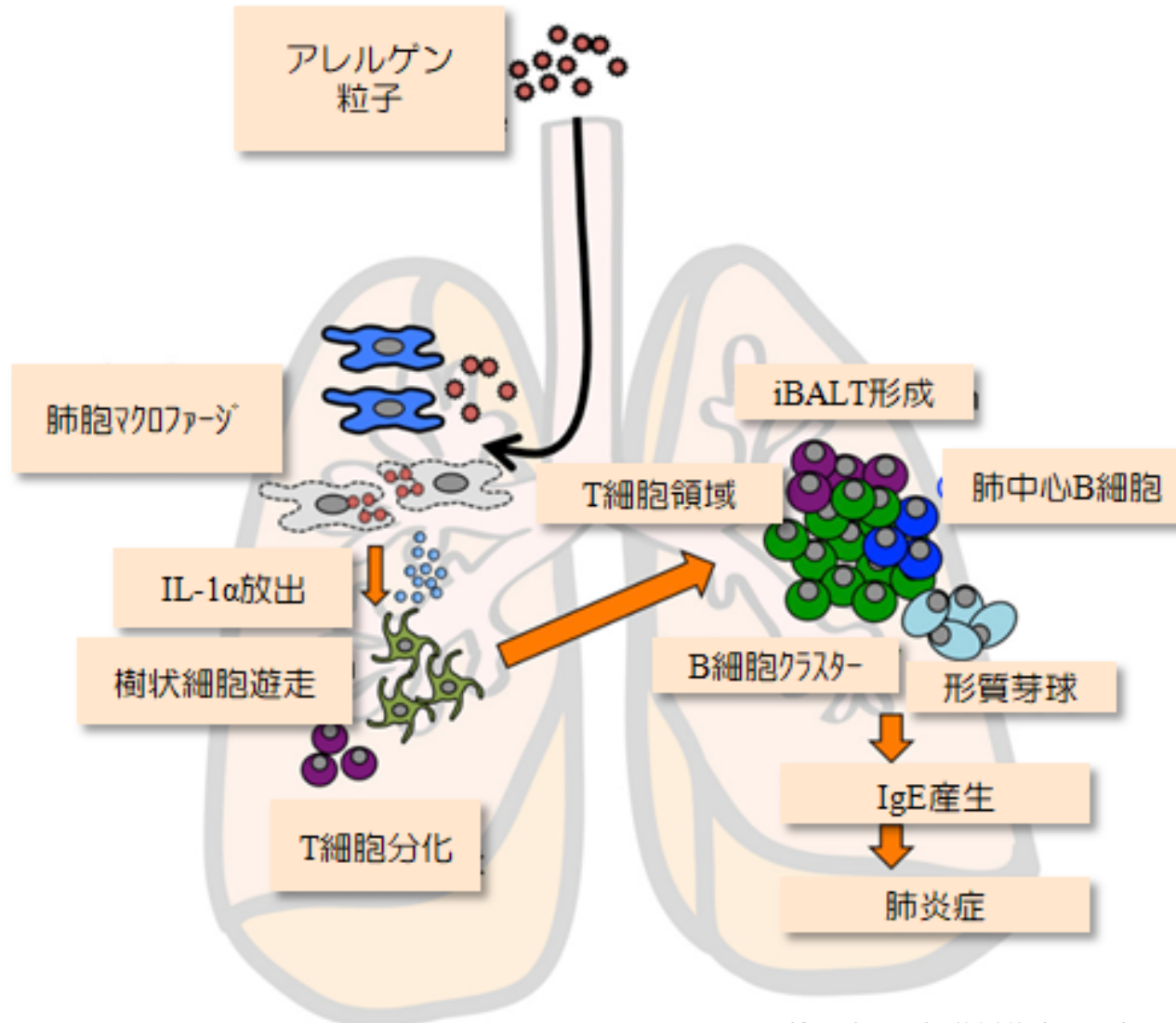


NAL + 8-Methoxypsoralen



2. ADRAによる呼吸器感作性の評価

呼吸器感作性のメカニズム



2. ADRAによる呼吸器感作性の評価

職業性喘息について

- 成人の喘息患者数：約700,000人*
- 職業性喘息の患者は上記の9～15% (63,000～105,000人)とされている。
- 呼吸器感作性物質は喘息の原因となることから、取り扱いには防護マスク等、皮膚感作性物質よりも嚴重な保護具の着用が必要となる。

*平成29年患者調査(政策統括官付参事官付保健統計室)より算出



2. ADRAによる呼吸器感作性の評価

皮膚感作性と呼吸器感作性の比較

	皮膚感作性物質	呼吸器感作性物質
免疫細胞	Th1細胞が優勢	Th2細胞が優勢
IgE	関与なし	関与の有無は未解決
サイトカイン	TNF- α , IFN- γ の産生増加	IL-4, IL-5, IL-10およびIL- γ の産生増加
代謝活性化	—	肺胞マクロファージ, 肺胞II型上皮細胞, 気管支上皮細胞
	—	代謝I相, II相酵素を発現
被験物質	ハードおよびソフトな求電子物質 例) アクリレート, アルデヒド	ハードな求電子物質 例) アシル化剤, シッフ塩基
	—	揮発性, クロスリンク
	分子量500以下	分子量1000以下
	細胞タンパクと結合	血清タンパクと結合
	呼吸器感作性を示すとは限らない	皮膚感作性を示す

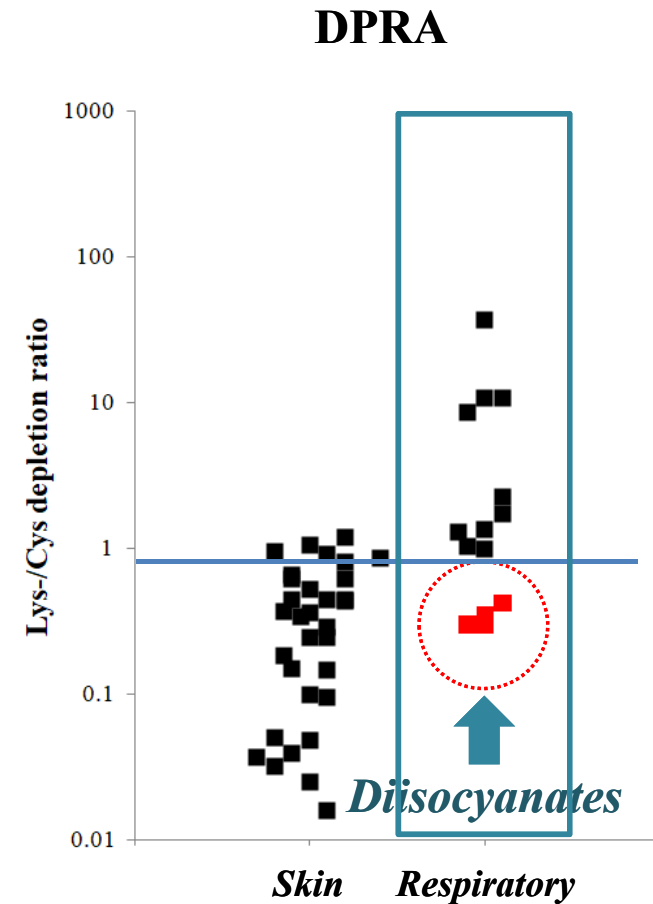
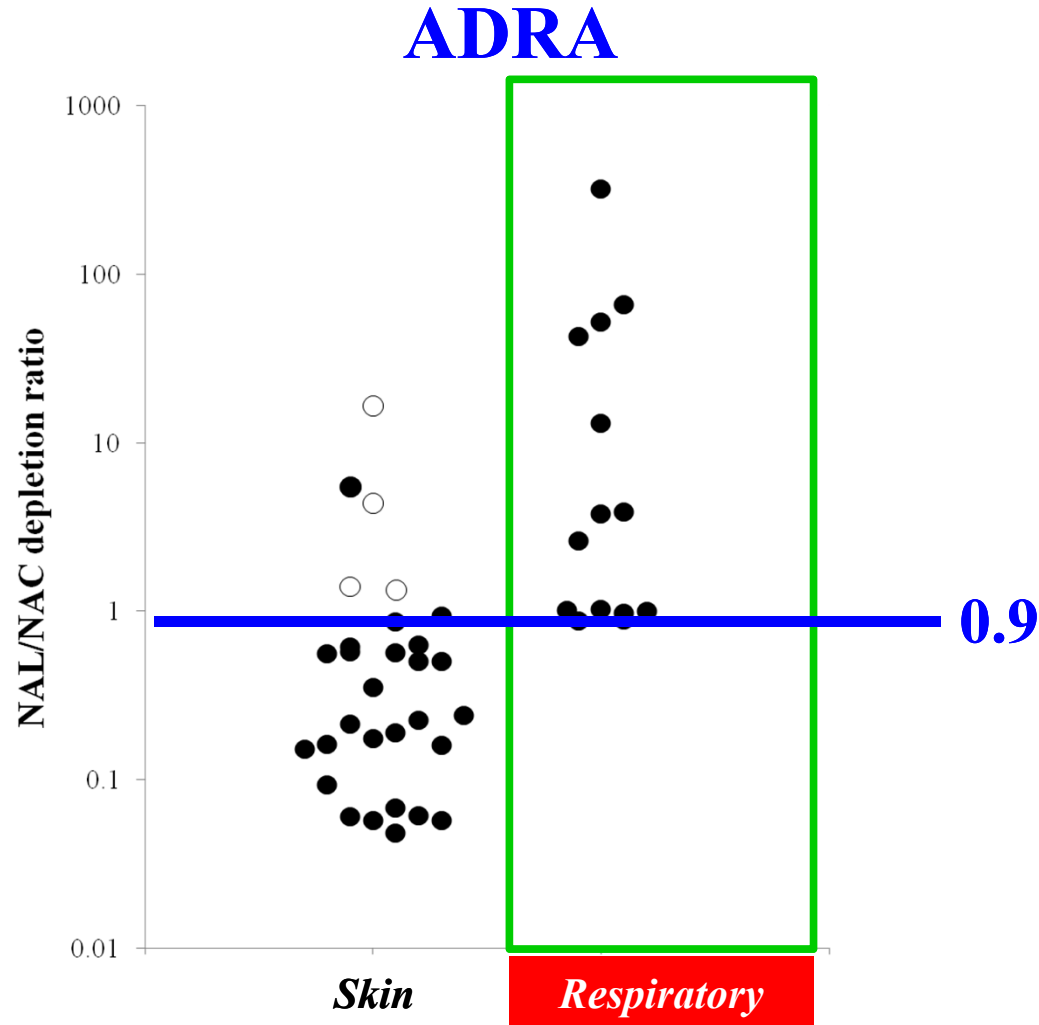
2. ADRAによる呼吸器感作性の評価

ソフト/ハードな求電子物質とは

ハードな求電子物質	ソフトな求電子物質
アルデヒド (Schiff base former)	α,β -不飽和カルボニル類 (Michael acceptor)
酸無水物 (acylating agent)	キノン類 (Michael acceptor)
酸ハライド (acylating agent)	アリルハライド (S _N 2 electrophile)
イソシアネート類 (acylating agent)	アリル硫酸, リン酸エステル (S _N 2 electrophile)
適当な離脱基を持つカルボニル基 (acylating agent)	エポキシ (S _N 2 electrophile)
主にNH ₂ 基と反応	主にSH基と反応

2. ADRAによる呼吸器感作性の評価

ADRAによる呼吸器感作性物質の評価



最後に

ADRA OECDガイドライン化にご協力いただいた方々

【バリデーション委員長】

- 小野 敦 (岡山大学)

【JaCVAM】

- 小島 肇 (NIHS)

【免疫専門家】

- Jon Richmond(UK)
- Nicole Kleinstreuer(USA)
- Bae-Hwa Kim(Korea)
- 河上 強志(NIHS)
- 小島 幸一(FDSC)

【統計解析】

- 寒水 孝司 (東京理科大学)
- 中山 拓人(東京理科大学)
- 草生 武 (東京理科大学)

【バリデーション参加ラボ】

- 渡辺真一 (ライオン)
- 菅原 経継(ライオン)
- 山鹿 宏彰(ライオン)
- 吉田 浩介(ライオン)
- 若林 晃次 (三井化学)
- 田原 宥 (三井化学)
- 堀江 宣行(住友化学)
- 藤本 恵一 (住友化学)
- 草苅 啓 (日産化学)
- 黒川 嘉彦(日産化学)
- 竹内 和也(日産化学)
- 神谷孝平(日産化学)

【第三者評価会議】

- David Basketter(UK)
- Steven Enoch(UK)
- Joanna Matheson(USA)
- Stanislav Vukmanovic(USA)
- Kyung-Min Lim(Korea)
- 板垣 宏(元横浜国立大学
ITACSコンサルティング)
- 足利 太可雄(NIHS)

【リードラボ：富士フィルム】

- 藤田 正晴
- 秋元 美由紀
- 今村 弥佳
- 勝岡 尉浩
- 鰐淵 彩花
- 佐藤 彩子
- 笠原 利彦

NIHS：国立医薬品食品衛生研究所

FDSC：一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

ガイドライン化プロジェクトにおける研究助成

- 日本化学工業協会「LRI（長期自主研究）指定課題」（2016, 2017年度）
- 日本動物実験代替法学会「試験法評価に関する研究助成金」（2016年度）

FUJIFILM
Value from Innovation