

再構築皮膚モデルを用いたin vitro皮膚感作性試験法 EpiSensA (Epidermal Sensitization Assay)の バリデーション研究

助成期間：2018年6月～2022年2月（第6期～第9期）

花王株式会社
水町秀之 鈴木将

アレルギー性接触皮膚炎

➤ 感作性物質により生じる皮膚疾患

精神的影響大、社会的関心が高い

➤ 生涯にわたる懸念

QOLの低下



ヘアカラーによる症例
<https://www.caa.go.jp/>

皮膚感作性は重要な安全性評価項目の一つ



動物実験廃止に対する世界的関心の高まり

信頼度の高い代替法が複数開発

例) **h-CLAT** ...

- 花王と資生堂の共同開発
- 樹状細胞に着目した世界初のOECD TG試験法

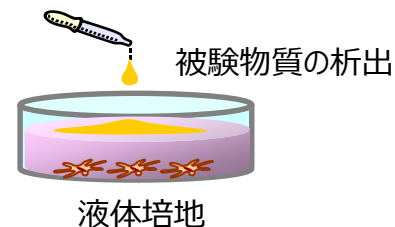


動物実験における陽性/陰性を
正しく予測できた割合

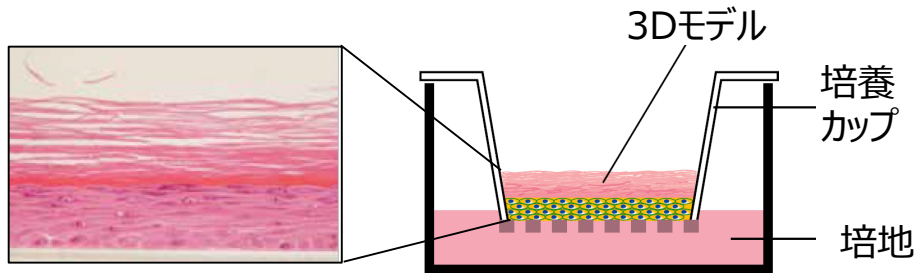
85% (N=142)

既存代替法の共通課題

難水溶性物質の評価が困難



再構築ヒト表皮モデル (3Dモデル)



LabCyte EPI-MODEL 24 (J-TEC)

http://www.jpte.co.jp/business/LabCyte/EPI_MODEL.html

- ヒト正常角化細胞から構成
- 親油性溶媒で直接曝露が可能
- ヒト表皮に高い類似性 (構造、代謝酵素 など)

F. Oesch, et al., 2014

動物実験同様の広い適用性を有するツールとして期待

感作の成立においてキーとなる「ケラチノサイトの応答」を評価する試験として、

EpiSensa (Epidermal Sensitization Assay) を開発

被験物質の溶解性確認

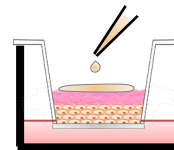
曝露に使用する溶媒をAOO, 蒸留水, 50% EtOHから選択
(最も高い濃度で溶解できた溶媒ひとつを選択)



AOO・・・Acetone : Olive oil=4 : 1

Dose finding study

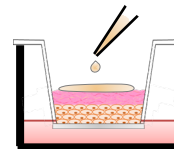
被験物質の希釈系列を作成 (公比4)
viabilityを指標に、Main studyの曝露濃度域を決定



曝露時間 : 6h

Main study

被験物質の希釈系列を作成 (公比2)
リアルタイムPCRにより マーカー遺伝子発現を測定



曝露時間 : 6h

陽性判定基準

4つのうち少なくとも1つのマーカー遺伝子で陽性判定基準*を超える相対発現 (cell viability \geq 80%)

*: *ATF3*>15-fold, *GCLM*>2-fold, *DNAJB4*>2-fold, *IL-8*>4-fold

OECD GL No.497, Urbisch et al., 2015, Jaworska et al., 2015, ICCVAM LLNA database, 2013

	EpiSensA	DPRA	KeratinoSens	h-CLAT	EpiSensA (水溶性物質)
陽性・陰性を 判定できた物質数	69 /69	68/69	64 /69	40 /69	67
感度 (%)	83 (43/52)	56 (29/52)	63 (30/48)	90 (27/30)	94 (46/49)
特異度 (%)	65 (11/17)	69 (11/16)	19 (3/16)	0 ** (0/ 10)	67 (12/18)
一致率 (%)	78 (54/69)	59 (40/68)	52 (33/64)	68 (27/40)	87 (58/67)

** : LogKow \geq 3.5の被験物質は「陰性」と結論できない (OECD TG 442E)

- 既存代替法に適用できない難水溶性物質でもすべて判定可能
- 水溶性物質と同様に高い予測性

被験物質の水溶解性に関わらず広い適用範囲と高い予測性を確認



OECDテストガイドライン化を目指し 公的Validation試験へ

参加施設： (株)コーセー、 (一財)食品薬品安全センター、 ライオン(株)

➤ Phase I 施設内再現性 検証結果

Phase I-A, I-B, I-C の3回に分けて実施（各 5 物質×3回の繰り返し試験）
ブラインド試験、目標値は **85%**

➤ Phase II 施設間再現性 検証結果

Chemical No.	Lab. A			Lab. B			Lab. C		
	set 1	set 2	set 3	set 1	set 2	set 3	set 1	set 2	set 3
1	P	P	P	P	P	P	P	P	P
2	N	N	N	N	N	N	N	P	N
3	N	N	N	P	P	N	P	P	N
4	P	P	P	P	P	P	P	P	P
5	P	P	P	P	N	P	P	P	P

P: 陽性 N: 陰性

施設内再現性：

Lab A: 5/5 (100%)

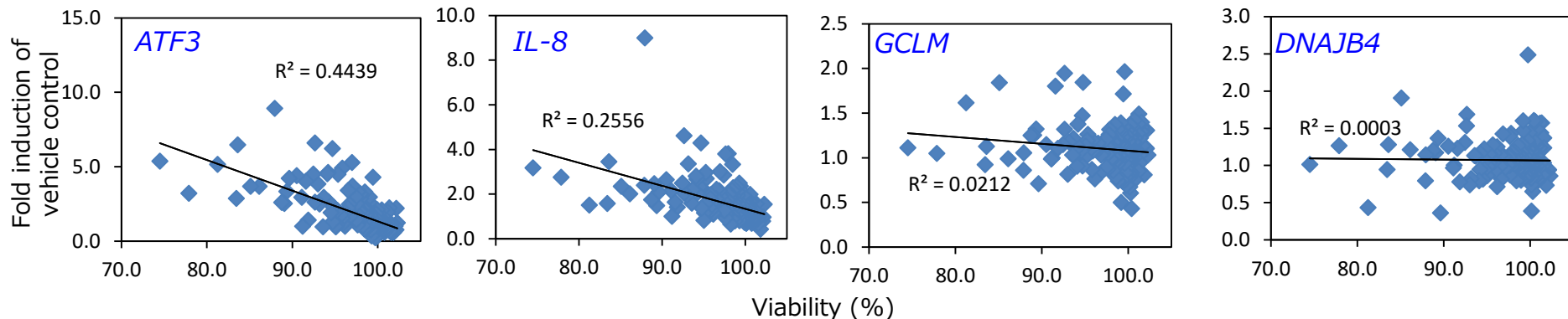
Lab B: 3/5 (**60%**)

Lab C: 3/5 (**60%**)

プロトコル由来の原因を考察し、3点の変更により課題解決

(本発表では溶媒対照の成立条件の変更のみ紹介)

溶媒対象におけるマーカー遺伝子の遺伝子発現量(Fold induction)と viabilityの相関性 (n=183)



ATF3 と IL-8 で弱い相関を確認

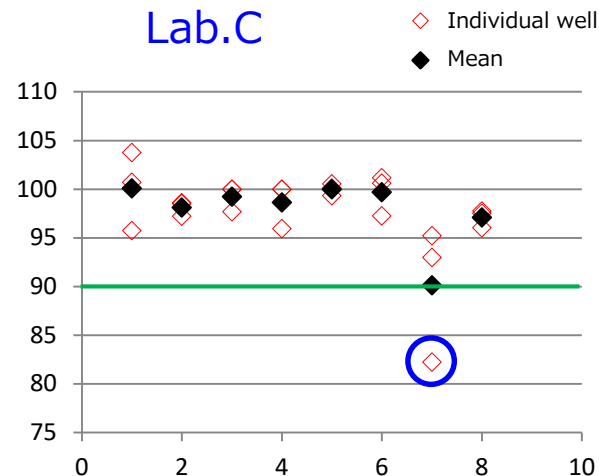
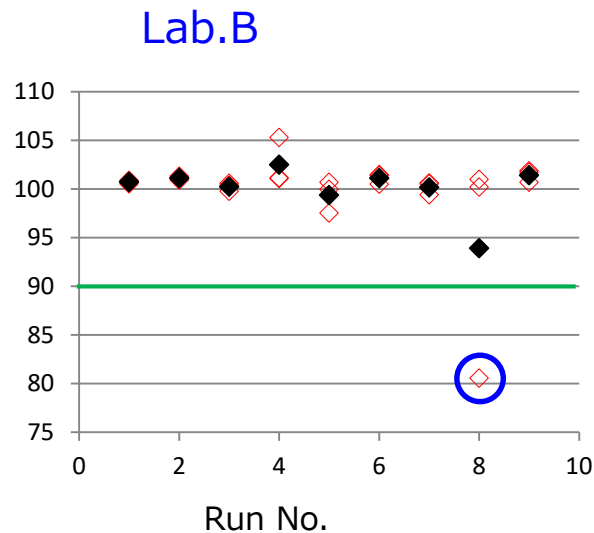
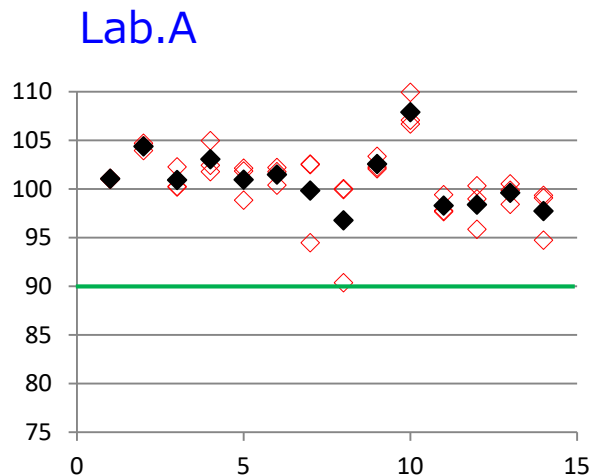
⇒ 溶媒対照のviabilityの低下は、被験物質の過小評価を引き起こす可能性

溶媒対照の成立条件

N=3の平均viability ≥ 90%

参加施設における溶媒対照のviabilityのバラつき

Viability of vehicle control (%)



すべての試験で成立条件（平均値 \geq 90%）は達成

Lab.B, Cにて、1wellだけviabilityが大きく低下するケースを確認

viabilityが“外れ値”のwellが、被験物質の過小評価を及ぼす可能性を検証
必要に応じてプロトコルの改訂

仮説

Viability < 90%となった溶媒対照 1well のデータ（外れ値）を用いると、
被験物質の過小評価をもたらす懸念がある

アプローチ

試験開発施設でこれまで最も多くの試験で共通して暴露された被験物質に着目

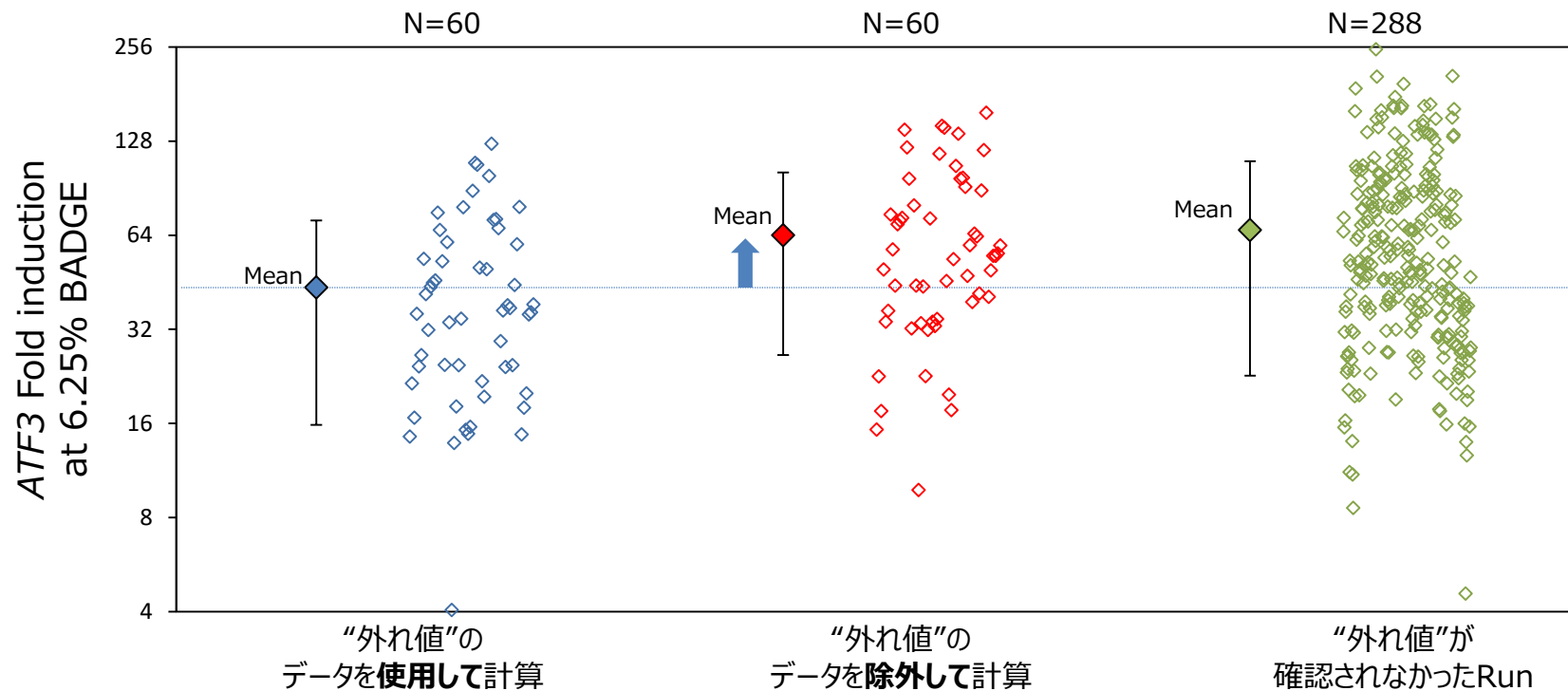
⇒ 6.25% BADGE (計116試験で暴露) BADGE : Bisphenol A diglycidyl ether

Case I: 溶媒対照でviability < 90%の“外れ値”が確認された試験 (20/116)

Case II: 溶媒対照で“外れ値”が確認されなかった試験 (96/116)

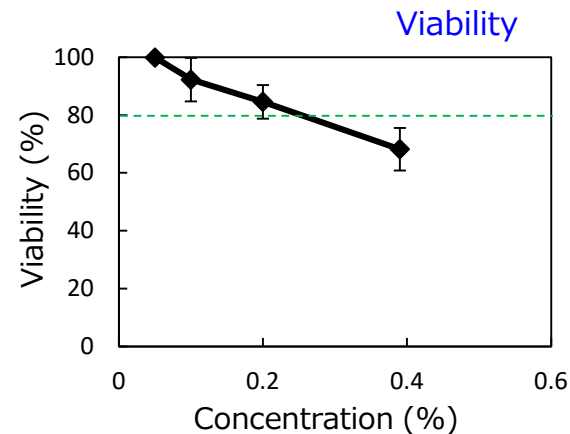
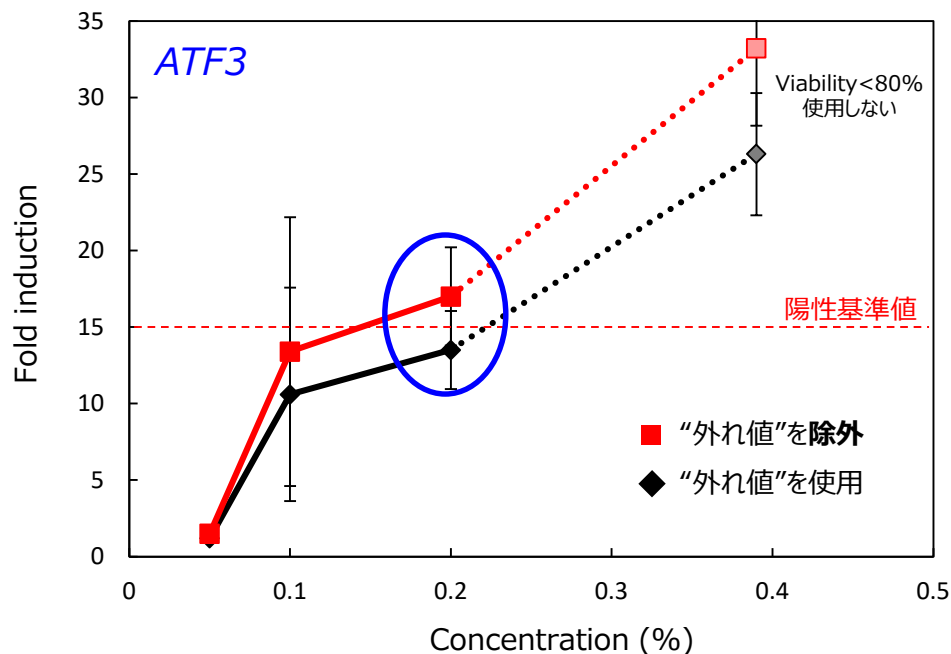
- BADGE曝露時のATF3において、viabilityが“外れ値”のwellによる過小評価の有無を検証
- “外れ値”のデータを使用しないことで、過小評価が回避可能かを検証

“外れ値”による過小評価の可能性検証



- viabilityが“外れ値”のデータを使用すると、過小評価が起きる (◆ vs. ◆)
- viabilityが“外れ値”のデータを除外すると、過小評価を回避可能 (◆ vs. ◆)

Chemical No.3 (Lab.B)

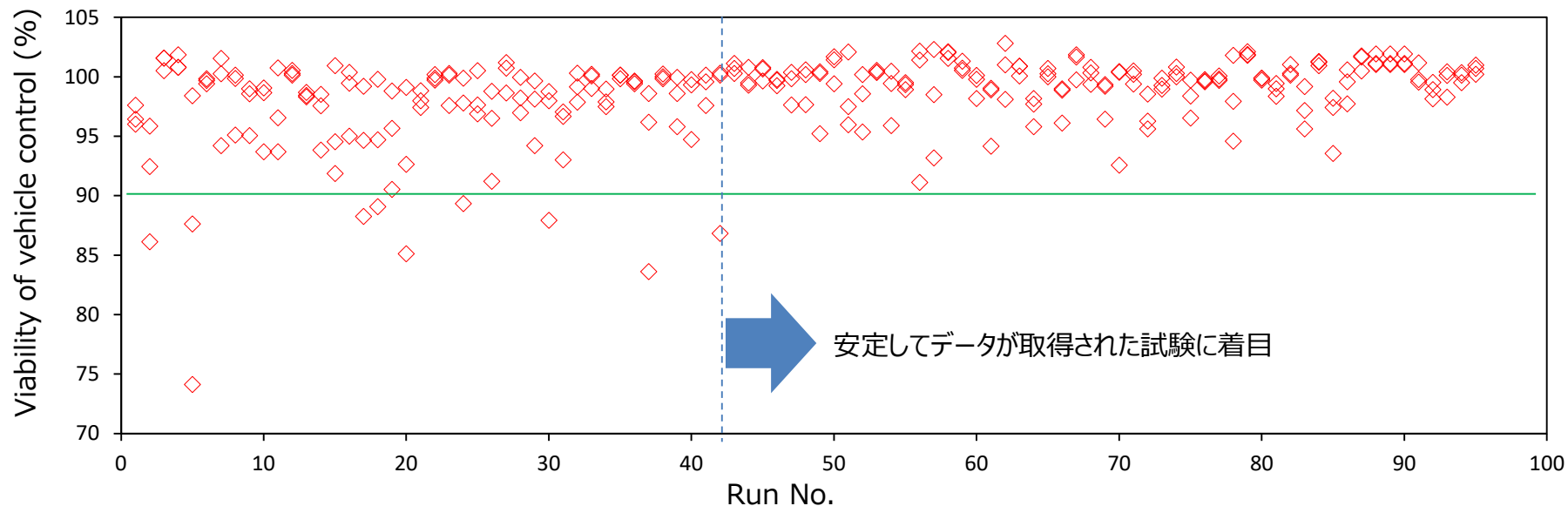


※4遺伝子の代表としてATF3のみを表示

溶媒対照の“外れ値”を除くことで、過小評価が無くなり、陽性 / 陰性の結果が変わる事例を確認

マーカー遺伝子の発現が基準値近傍の場合、過小評価により結果が変わり得る

試験開発施設における溶媒対照の個々のwellのデータのばらつきを考慮



Mean = 99.54 (%) S.D. = 2.01(%) (Mean) - 2 (S.D.) = 95.5(%)

95% viability がばらつきを考慮した新しい成立基準になり得る

<validation開始時の溶媒対照の成立基準>

- 3wellのviabilityの平均値が90%以上とならなければならない



<溶媒対照の新しい成立基準>

- 個々のwellにおいて、少なくとも2wellでviabilityが**95%以上**とならなければならない
- もし1wellで95%を下回った場合、残り2wellのデータのみを結果の算出に用いる

その他にも2点のプロトコル改訂を実施

- 濃度依存応答が急峻な場合の再試験条件の明確化
- 内部標準（GAPDH）に関するやり直し要件の追加

Chemical No.	Lab. A			Lab. B			Lab. C		
	set 1	set 2	set 3	set 1	set 2	set 3	set 1	set 2	set 3
1	P	P	P	P	P	P	P	P	P
2	N	N	N	N	N	N	N	P	N
3	N/P	N/N	N/N	P	P	N/P	P	P	N/P
4	P	P	P	P	P	P	P	P	P
5	P	P	P	P	N/P	P	P	P	P

P : 陽性
N : 陰性

施設内再現性：

Lab A: 4/5 (80%)

Lab B: 5/5 (**100%**)

Lab C: 4/5 (**80%**)

プロトコルの改訂により施設内再現性が向上

改訂後のプロトコルを使用

Chemical No.	Lab. A			Lab. B			Lab. C		
	set 1	set 2	set 3	set 1	set 2	set 3	set 1	set 2	set 3
6	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8	N	N	N	N	N	N	N	N	N
9	P	P	P	P	P	P	P	P	P
10	P	P	P	P	P	P	P	P	P

P : 陽性
N : 陰性

全施設で施設内再現性100% (5/5)

改訂後のプロトコルを使用

Chemical No.	Lab. A			Lab. B			Lab. C		
	set 1	set 2	set 3	set 1	set 2	set 3	set 1	set 2	set 3
11	N	N	N	N	N	P	N	N	P
12	P	P	P	P	P	P	P	P	P
13	P	P	P	P	P	P	P	P	P
14	P	P	P	P	P	P	P	P	P
15	P	P	P	P	P	P	P	P	P

P: 陽性
N: 陰性

施設内再現性：

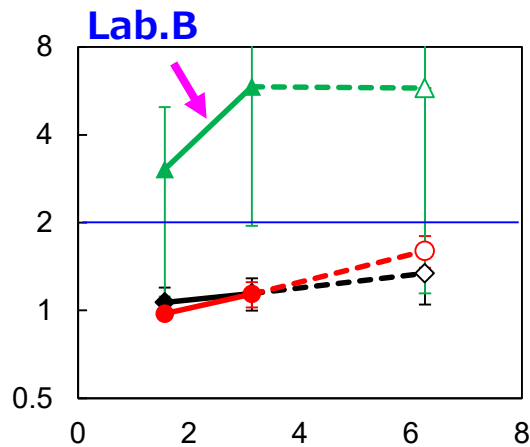
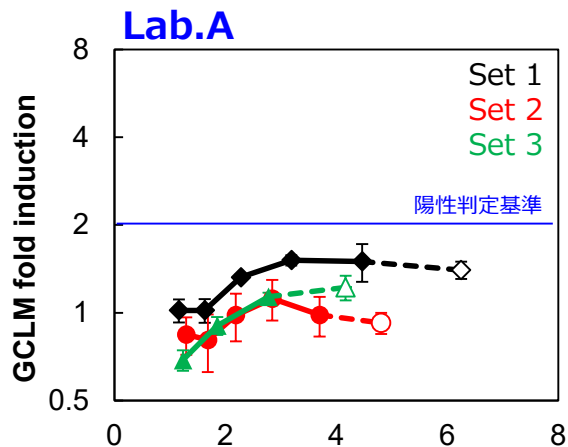
Lab A: 5/5 (100%)

Lab B: 4/5 (80%)

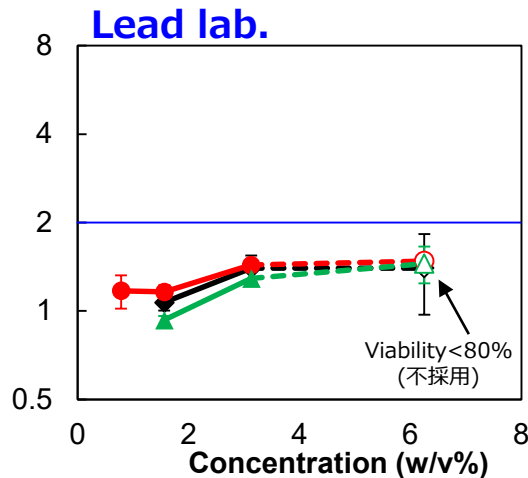
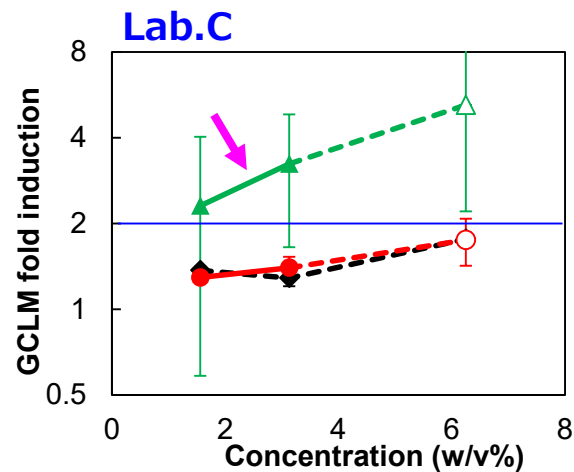
Lab C: 4/5 (80%)

1 物質で施設内再現性を確認できず、原因を考察

Chem.11の4社間の比較 (GCLM)



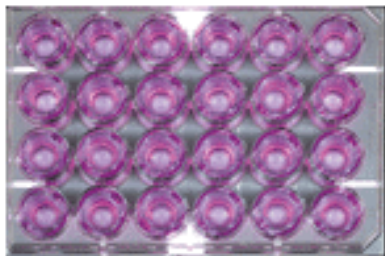
- ✓ 施設間で比較しても、陽性になったSetでは明らかに挙動が異なる
- ✓ 陽性になったSetでは明らかにばらつきが大きい



原因究明のために
データを詳細に確認

Lab.C Set3のプレートデザイン

	1	2	3	4	5	6
A	溶媒 control			No.13	0.4%	
B	No.11	1.6%		No.13	0.8%	
C	No.11	3.2%		No.13	1.6%	
D	No.11	6.4%		No.13	3.2%	



GCLM の Fold induction (陽性判定基準 : 2)

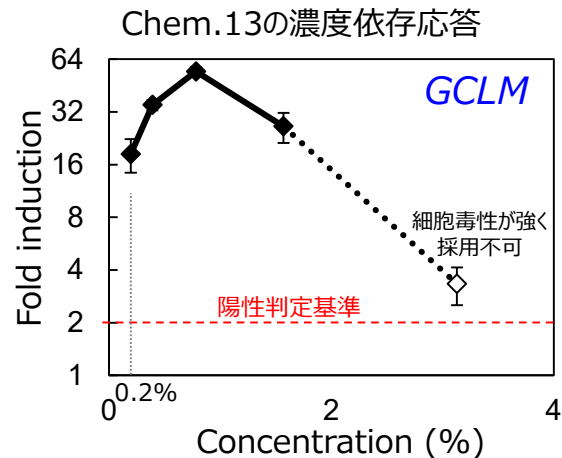
	1	2	3	4	5	6
A	1.1 *	2.1 *	3.9 *	54.2	53.2	49.1
B	1.0	1.7	4.3	86.3	82.2	83.7
C	1.6	3.4	4.7	35.3	41.8	25.9
D	1.6	6.2	7.6	Cytotoxic		

- Chem No.13に近いwellで強く発現亢進する傾向あり
- 溶媒controlでも遺伝子が発現亢進

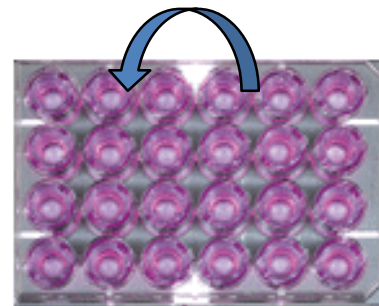
Chemical No.13の移り込みを示唆

*: Non-treated ctrlに対する相対値

- 液体、揮発性あり
- 動物実験、およびヒト試験にて強感作性
- EpiSensAにおいて非常に低濃度で陽性となる
(計算値として暴露濃度0.006%)



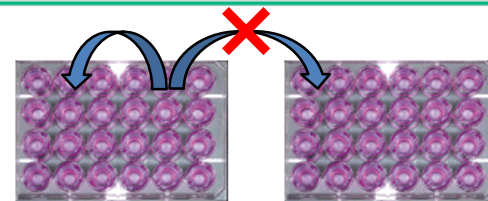
Chem. No.13のCross-contaminationが原因と判明
(揮発した被験物質の他wellへの移り込み)



揮発性のある強感作性物質への対策が必要

仮説

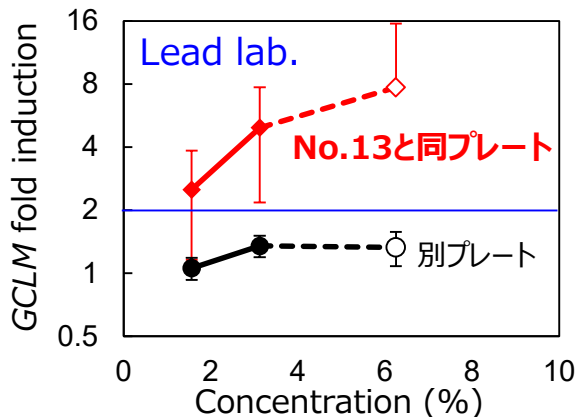
6h 曝露時にプレートに分ければ
Cross-contaminationの影響はない



検証

Lab.Cのプレートデザインを用いて再現性実験

Chemical No.11 (陰性物質) の遺伝子発現結果



	1	2	3	4	5	6
A	溶媒 control			No.13		
B	No.11			No.13		
C	No.11			No.13		
D	No.11			No.13		

	1	2	3	4	5	6
A	溶媒 control					
B	No.11					
C	No.11					
D	No.11					

	1	2	3	4	5	6
A	No.13					
B	No.13					
C	No.13					
D	No.13					

被験物質のプレートを分けることで回避可能

被験物質が液体ならば、他の被験物質とはプレートを分けて培養するようにプロトコル変更

Phase I の結果まとめ

P: 陽性 N: 陰性

Chemical No.	Lab.A			Lab.B			Lab.C		
	Set 1	Set 2	Set 3	Set 1	Set 2	Set 3	Set 1	Set 2	Set 3
1	P	P	P	P	P	P	P	P	P
2	N	N	N	N	N	N	N	P	N
3	P	N	N	P	P	P	P	P	P
4	P	P	P	P	P	P	P	P	P
5	P	P	P	P	P	P	P	P	P
6	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8	N	N	N	N	N	N	N	N	N
9	P	P	P	P	P	P	P	P	P
10	P	P	P	P	P	P	P	P	P
11	N	N	N	N	N	P	N	N	P
12	P	P	P	P	P	P	P	P	P
13	P	P	P	P	P	P	P	P	P
14	P	P	P	P	P	P	P	P	P
15	P	P	P	P	P	P	P	P	P

✓ Phase I における施設内再現性

Lab.A: 93% Lab.B: 93% Lab.C: 87%

目標値(85%)を全施設で達成

Phase I の完了に合意

➤ Phase I 施設内再現性 検証結果

Phase I-A, I-B, I-C の3回に分けて実施（各 5 物質×3回の繰り返し試験）
ブラインド試験、目標値は **85%**

➤ Phase II 施設間再現性 検証結果

- Phase IIとして12物質を1回試験
- Phase I と合わせた27物質を使用、目標値は **80%**
3回の繰り返し試験結果が一致しない場合は、多数決で決定

Phase II 試験結果 および 施設間再現性

	Chemical No.	Lab.A	Lab.B	Lab.C
Phase I	1	P	P	P
	2	N	N	N
	3	N	P	P
	4	P	P	P
	5	P	P	P
	6	N	N	N
	7	N	N	N
	8	N	N	N
	9	P	P	P
	10	P	P	P
	11	N	N	N
	12	P	P	P
	13	P	P	P
	14	P	P	P
	15	P	P	P
Phase II	16	N	P	P
	17	P	N	P
	18	N	N	N
	19	P	P	P
	20	P	P	P
	21	P	P	P
	22	P	P	P
	23	P	P	P
	24	P	P	P
	25	P	P	P
	26	P	P	P
	27	P	P	P

- ✓ 施設間再現性 **89%** (24/27) となり、目標達成
- ✓ 再現性が取れなかった3物質はいずれも陽性基準値
近傍の応答であり、再現性を取るのが難しかったと考察
- ✓ 曝露操作手順を明確化するようにプロトコル微改訂

Phase II の完了に合意

まとめ

- ✓ 試験結果をもとにプロトコルを改訂することで再現性が向上
- ✓ 15物質における施設内再現性の目標値（85%）を達成
- ✓ 27物質における施設間再現性の目標値（80%）を達成
- ✓ Validation 運営委員会より、Phase I, Phase II の完了に合意
- ✓ 2022年5月にdraft validation report を最終化

今後の予定

- ✓ **2022年 5月～** Peer review実施中
- ✓ **2022年 11月** OECD専門家会議にて議論
- ✓ **2024年以降** TGとして公表

国立医薬品食品衛生研究所, JaCVAM

- 小島 肇 (JaCVAM representative, Chair, QC manager)
- 足利 太可雄

東京理科大学

- 寒水 孝司

(一財) 化学物質評価研究機構

- 武吉 正博

Validation運営委員 海外メンバー

- David Basketter (DABMEB Consultancy Ltd.)
- Chantra Eskes (SeCAM)
- Sebastian Hoffmann (seh consulting + services)
- David M. Lehmann (U.S. EPA)

(株) コーセー

- 水野 誠 (Study director, 2020年4月～)
- 今井 教安 (Study director, ~2020年3月)
- 佐久間 めぐみ
- 芝田 桃子

(一財) 食品薬品安全センター-秦野研究所

- 渡辺 美香 (Study director)
- 生悦住 茉友 (~2020年3月)
- 梶原 三智香 (2020年4月～)
- 安田 美智代 (2020年4月～)

ライオン (株)

- 渡辺 真一 (Study director)
- 上野 順子

日化協LRI 事務局

- 稲若 邦文 (住友化学株式会社)
- 平井 祐一 (日産化学株式会社)
- 長井 大地 (日本化薬株式会社)
- 須方 督夫 (住友化学株式会社)

- 事務局の皆様

4期（第6期～第9期）に渡り多大なるご支援を頂きました。

厚く御礼申し上げます。