

化学物質の皮膚感作性評価について

～再構築皮膚モデルを用いた代替法EpiSensAの開発と活用～

花王株式会社
水町秀之 宮澤正明

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

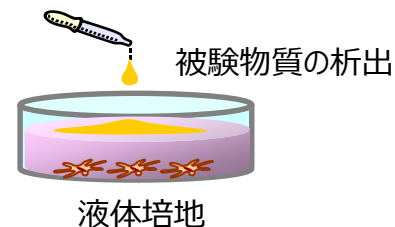


動物実験における陽性/陰性を
正しく予測できた割合

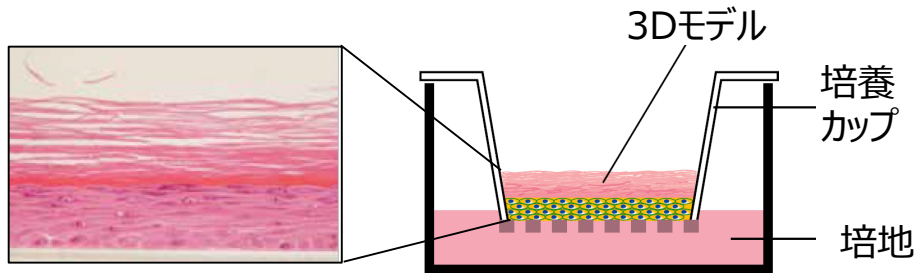
85% (N=142)

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

I. EpiSensAの開発と評価

- 感作マーカー遺伝子の選定、プロトコル
- 感作性予測性能の検証
- OECDテストガイドライン化に向けたvalidation研究

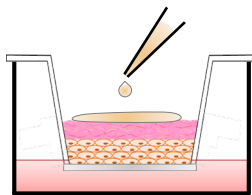
II. EpiSensAを活用した応用検討

- 感作強度予測モデルの検討、組み合わせ評価系の構築
- 感作性リスク評価への応用

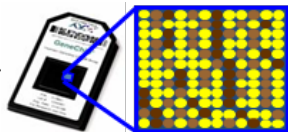
皮膚感作における毒性発現経路 (AOP) key event 2;

ケラチノサイトにおける抗酸化応答遺伝子の発現、およびdanger signalの伝達 (e.g. 炎症性サイトカインやATPの放出)

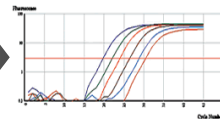
マーカー遺伝子選定



感作性物質もしくは
非感作性物質

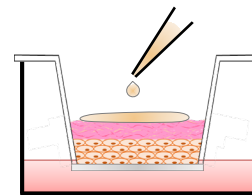


マイクロアレイ (n=3)



Real-time PCR
(n=3)

**ATF3, GCLM, DNAJB4,
IL-8, HSPA6, HSPH1**



ECVAM reference
16 物質

**ATF3, GCLM,
DNAJB4, IL-8**

〈選定基準〉

- 感作性物質曝露時に有意に亢進し、非感作性物質で亢進しないこと
- 皮膚感作時におけるケラチノサイトの応答との関連性
- マイクロアレイとReal-time PCRでの再現性



ATF3, GCLM, DNAJB4, IL-8 遺伝子は、
バイオマーカーとして感作性物質と非感作性物質を仕分け可能

被験物質の溶解性確認

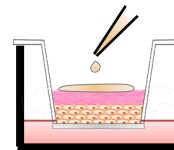
曝露に使用する溶媒をAOO, 蒸留水, 50% EtOHから選択
(最も高い濃度で溶解できた溶媒ひとつを選択)



AOO...Acetone : Olive oil=4 : 1

Dose finding study

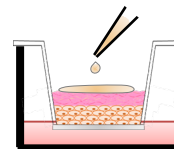
被験物質の希釈系列を作成 (公比4)
viabilityを指標に、Main studyの曝露濃度域を決定



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

I. EpiSensAの開発と評価

- 感作マーカー遺伝子の選定、プロトコル
- 感作性予測性能の検証
- OECDテストガイドライン化に向けたvalidation研究

II. EpiSensAを活用した応用検討

- 感作強度予測モデルの検討、組み合わせ評価系の構築
- 感作性リスク評価への応用

	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	37 /69	67
感度 (%)	83 (43/52)	50 (26/52)	60 (29/48)	100 (27/27)	94 (46/49)
特異度 (%)	65 (11/17)	63 (10/16)	13 (2/16)	0* (0/ 10)	67 (12/18)
一致率 (%)	78 (54/69)	53 (36/68)	48 (31/64)	73 (27/37)	87 (58/67)

* : LogKow ≥ 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

被験物質の溶解性に関わらず広い適用範囲と高い予測性

I. EpiSensAの開発と評価

- 感作マーカー遺伝子の選定、プロトコル
- 感作性予測性能の検証
- OECDテストガイドライン化に向けたvalidation研究

II. EpiSensAを活用した応用検討

- 感作強度予測モデルの検討、組み合わせ評価系の構築
- 感作性リスク評価への応用

- ・ 主導：JaCVAM (日本動物実験代替法評価センター)、 委員長：小島 肇 先生
- ・ 参加施設：(一財)食品薬品安全センター、(株)コーセー、ライオン(株)

目的

開発機関だけでなく、複数施設のデータに基づいたプロトコルの最適化、頑強性の証明
⇒ 検証の手段として、施設内/施設間の再現性を確認

目標値の設定



施設内再現性 (Phase I)



施設間再現性 (Phase II)

✓ 施設内再現性：
85% (15物質)

✓ 施設間再現性：
80% (27物質)

15物質を使用
物質名を伏せて3回 繰り返し

被験物質	施設A						
	1回目		2回目		3回目		
	コード	結果	コード	結果	コード	結果	
1	d	N	G	N	iii	N	○
2	u	P	E	P	x	P	○
3	m	N	R	P	iv	P	×
⋮	⋮		⋮		⋮		⋮
15	a	P	Q	P	xii	P	○

P: 陽性 N: 陰性

12物質を使用
物質名を伏せて1回

被験物質	施設A	施設B	施設C	
1	N	N	N	○
2	N	P	P	×
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
11	P	P	P	○
12	P	P	P	○

Phase I と合わせて27物質で評価

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

✓ 追加試験の実施基準などを明確化 するようにプロトコル微改訂

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、
目標値 (80%) を達成

✓ 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

I. EpiSensAの開発と評価

- 感作マーカー遺伝子の選定、プロトコル
- 感作性予測性能の検証
- OECDテストガイドライン化に向けたvalidation研究

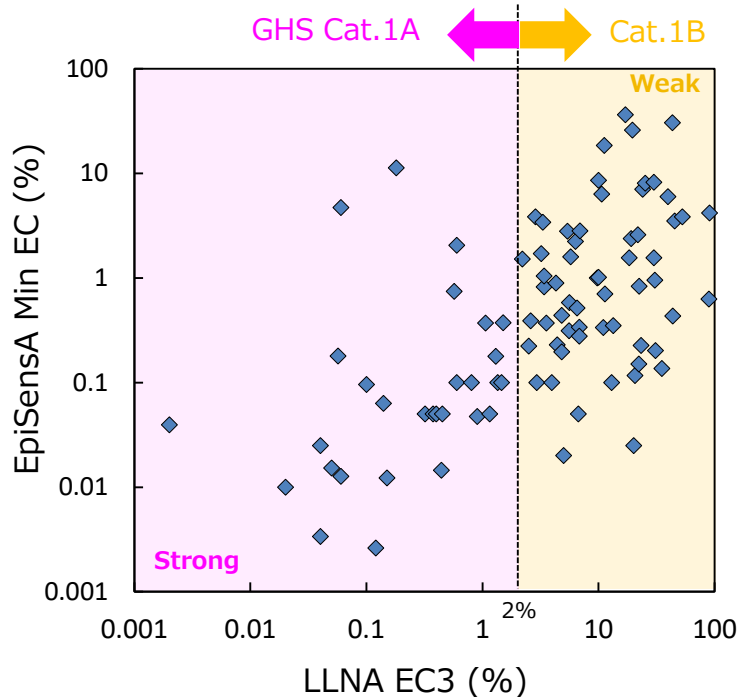
II. EpiSensAを活用した応用検討

- 感作強度予測モデルの検討、組み合わせ評価系の構築
- 感作性リスク評価への応用

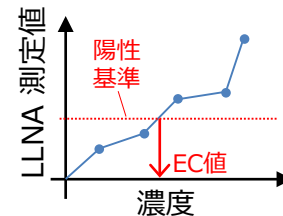
強度の考え方

- 低濃度での曝露であっても陽性（感作成立）⇒ **強感作性**
- 高濃度での曝露のみで陽性（感作成立）⇒ **弱感作性**

EpiSensA陽性 89物質



- ✓ UN GHS分類においては、動物実験LLNAにおけるEC値を基準に強度を分類



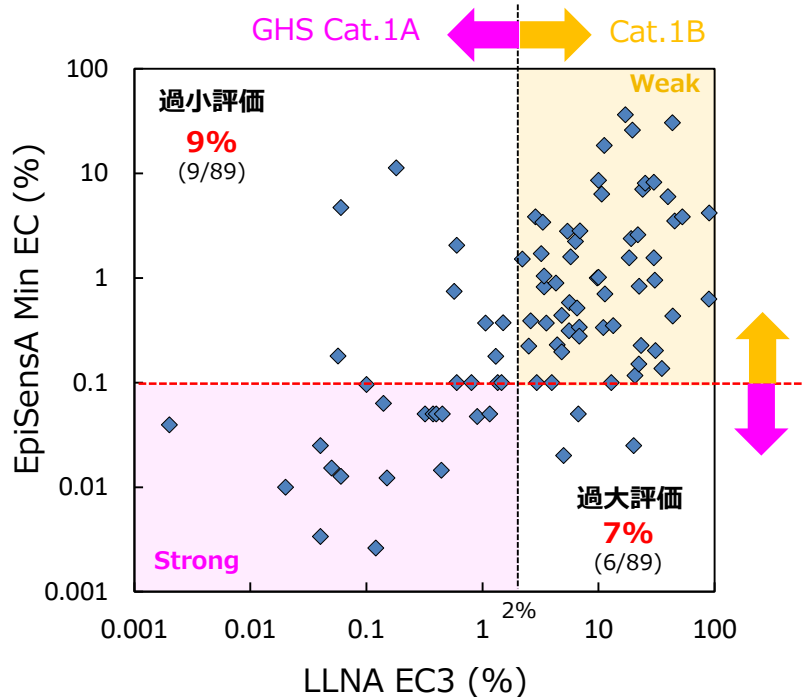
- ✓ EpiSensAにおけるEC値：4つのマーカー遺伝子におけるEC値のうち最小のもの (Min EC)

過大評価、過小評価が小さくなる閾値を探索

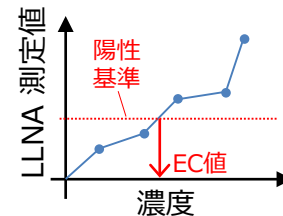
強度の考え方

- 低濃度での曝露であっても陽性（感作成立）⇒ **強感作性**
- 高濃度での曝露のみで陽性（感作成立）⇒ **弱感作性**

EpiSensA陽性 89物質



- ✓ UN GHS分類においては、動物実験LLNAにおけるEC値を基準に強度を分類



- ✓ EpiSensAにおけるEC値：4つのマーカー遺伝子におけるEC値のうち最小のもの (Min EC)

過大評価、過小評価が小さくなる閾値を探索

0.1%近傍で仕分けをすることで
高い強度予測性を達成可能

感作メカニズムは複雑、ひとつの試験だけでは適切な予測は困難

- ⇒
- ・ in vitroもしくはin silicoを用いて明確に定義された組み合わせ法 (DASS)が必要
 - ・ いずれかのKey event(KE)をカバーすべき (最低でも一つ)

Supporting document for evaluation and review of draft Guideline (GL) for Defined Approaches (DAs) for Skin Sensitisation, OECD, 2019

- ✓ KE1 : タンパク質との結合 … DPRA_{など}
- ✓ KE2 : ケラチノサイトの応答 … EpiSensA
- ✓ KE3 : 樹状細胞の応答 … h-CLAT_{など}

難水溶性物質への適用に課題

被験物質の溶解性に依存しない方法が必要

⇒ in silico modelに着目

KE2をベースとし、in silico modelと組み合わせたDASS ⇒ **RTS** (RhE-based Testing Strategy)

• **RTS v1**: EpiSensA + **TIMES-SS**
(有償モデル)



• **RTS v2**: EpiSensA + **OECD QSAR Toolbox**
(無償モデル)



<共通の特徴>

- ✓ 化学構造 (SMILES など) から予測
- ✓ 皮膚透過時の酵素代謝などを考慮
- ✓ 皮膚中タンパク質との結合を判定

EpiSensA と in silicoモデルによる Simple score-based system

Score	EpiSensA	in silico*
3	Strong	-
2	-	Strong
1	Weak	Weak
0	NS	NS

*: QSAR toolboxではLLNA予測結果を基に分類

RTSにおける強度予測
GHS Cat.1A : 5~4
GHS Cat.1B : 3~2
GHS NC : 1~0

I. EpiSensAの開発と評価

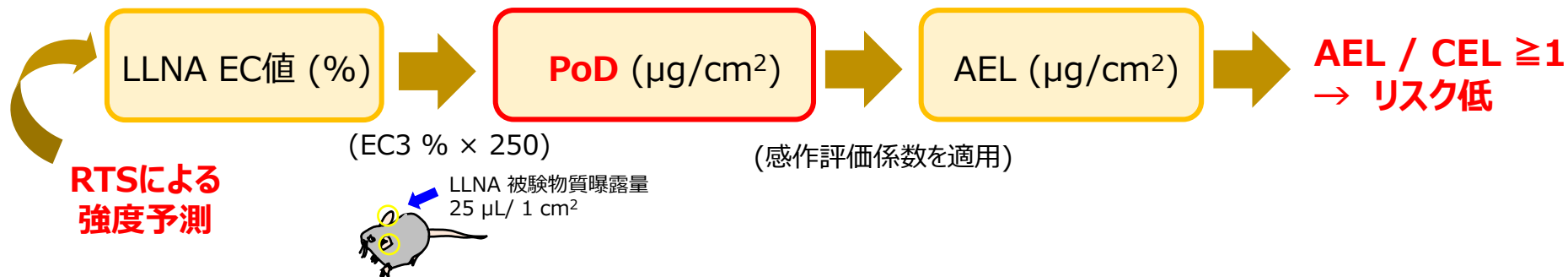
- 感作マーカー遺伝子の選定、プロトコル
- 感作性予測性能の検証
- OECDテストガイドライン化に向けたvalidation研究

II. EpiSensAを活用した応用検討

- 感作強度予測モデルの検討、組み合わせ評価系の構築
- 感作性リスク評価への応用

- 感作性：閾値・強度がある毒性 → 定量的リスク評価可

Gilmour et al., 2020
IDEA project, 2016
Api et al., 2008, 2020



- Point of departure (PoD: 容量反応から得られるアセスメント基準値) 決定はリスク評価において重要
- PoDは許容曝露量 (AEL) に換算、AELは消費者曝露量 (CEL) と比較
(Acceptable Exposure Level) (Consumer exposure level)
- PoDはLLNA EC値(%)から推算可能

動物を用いないリスク評価において、RTSによるEC値の予測 (強度予測) は有用

Score	EpiSensA	in silico
3	Strong	-
2	-	Strong
1	Weak	Weak
0	NS	NS

RTSにおける強度予測

GHS Cat.1A : 5~4

GHS Cat.1B : 3~2

GHS NC : 1~0

<UN GHS分類の定義>

GHS Cat.1A: LLNA EC \leq 2%

GHS Cat.1B: LLNA EC > 2%

GHS NC : LLNA 陰性 (EC>100%)

RTSの強度予測結果から、保守的に見積もったEC値を設定可能

RTS予測	保守的EC値 (%)	PoD ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	AEL* ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
GHS Cat.1A	設定不可	-	-
GHS Cat.1B	2	500	5
GHS NC	100	25,000	250

*: 感作評価係数 = 100の場合

e.g.) RTS v1により GHS Cat.1B と予測された香料 Farnesol をフェイスクリームに0.1%配合する場合、

製品の消費者曝露量** : $2.73 \text{ mg}/\text{cm}^2/\text{day}$ \Rightarrow 香料のCEL= $2.73 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

AEL / CEL = 1.83 ≥ 1 となり、懸念は小さいと考えられる

(RTS v2でも同様の結論)

** : 12th SCCS Notes of Guidance, 2023

- ✓ 難水溶性物質を含む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を目指したvalidationは終了し、reportがOECDに採択
- ✓ 感作強度予測に対する有用性を確認
- ✓ RTSによる強度予測は感作性リスク評価に有用

EpiSensAは既存代替法の共通課題に対して有用な試験法
強度予測が可能なRTSの構築により感作性リスク評価への応用も期待

<Validation運営委員会>

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

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)

<Validation参加施設>

(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。