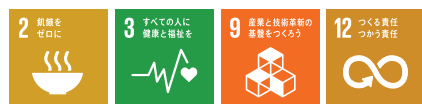


# 皮膚感作性評価の現状と今後の展望



住友化学株式会社

生物環境科学研究所

須藤 英典  
檜垣 環  
北野 紗季  
奥田 優  
堀江 宣行  
山口 尊史

## Perspectives on the Current State of Evaluation of Skin Sensitization

Sumitomo Chemical Co., Ltd.

Environmental Health Science Laboratory

Hidenori SUTO

Tamaki HIGAKI

Saki KITANO

Yu OKUDA

Nobuyuki HORIE

Takafumi YAMAGUCHI

Skin sensitization caused by chemicals is one of the high social interest diseases in terms of maintenance and control of working environments and general consumer safety. In recent years, there have been strong demands to replace animal testing with non-animal testing to detect the skin sensitizing potential of chemicals. Several non-animal tests have already been developed and are being used for regulation of each country. In this review, we provide an overview of skin sensitization, and introduce international regulatory trends, new non-animal tests, and our approach and future perspectives to the evaluation of skin sensitizing potential.

### はじめに

環境保全とともにヒトの健康の維持・増進意識の世界的な高まりから、農薬などを含む化学物質の自然環境およびヒトに与える影響の評価はますます重要になってきている。こうした状況の中、日常使用される家庭用品に含まれる一般化学品や、害虫、雑草および病原菌から作物を保護するため使用される農薬などに対して、ヒトの皮膚に対する感作性は世界各国で必須の評価項目として登録要件となっている。皮膚感作性とは、単一の物質または混合物が皮膚に接触した後に起こるアレルギー反応であり<sup>1)</sup>、皮膚感作性を有する物質に繰り返し接触することにより、皮膚に局所的な炎症（かぶれ）が生じる。近年、労働現場だけでなく一般消費者が手にする製品においても「かぶれ事故」が発生するなど、社会的関心の高い疾患の一つになっており、化学物質の皮膚感作性を精緻に評価することは重要である。

従来、皮膚感作性はモルモットやマウスを用いて評価されてきたが、動物福祉の観点から動物を用い

ない評価法（動物実験代替法）の開発が進み、農薬、防疫薬、一般化学品の安全管理に活用されつつある。

当社は、より安全で安心して使用できる化学物質の開発のために、この皮膚感作性の評価を世界各国の最新規制動向を踏まえつつ、常に最先端の評価手法を駆使して行うことで、その安全性を確認している。本稿では、皮膚感作性に関する評価について概説した上で、国際的な規制動向および新しい評価手法、それを踏まえた社内対応ならびに今後の展望について紹介する。

### 皮膚感作性評価

#### 1. 皮膚感作性評価の考え方

##### (1) アレルギーと皮膚感作性

我々の体は免疫機構により、病原体やウイルス、有害物質などの異物の侵入を防御している。一方、花粉や食物などの無害な物質に対して過剰もしくは不適切な防御反応を示すことがあり、これをアレルギーという。2011年の厚生労働省の報告では、「アレ

**Table 1** Classification of allergic reactions

| Reaction type          | Immune mechanism                              | Example                                   |
|------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|
| I (immediate)          | IgE-basophils and/or mast cells               | Acute asthma<br>Acute allergic rhinitis   |
| II (cytotoxic)         | IgG and/or IgM antigens in the cells membrane | Hemolytic anemia                          |
| III (immune complexes) | IgM and/or IgG complexes-soluble antigens     | Serum sickness                            |
| IV (late)              | T cells                                       | Tuberculin reaction<br>Contact dermatitis |

ルギーは国民の約5割が罹患する国民病」であり、2014年にはアレルギー疾患対策基本法が成立するなど、アレルギー疾患の急激な増加は大きな社会問題となっている<sup>2)</sup>。

アレルギーは大きく4タイプに分類される (Table 1)<sup>3)</sup>。抗体が関与するI～Ⅲ型に対し、皮膚感作性は、免疫細胞であるTリンパ球などの細胞が関与するIV型アレルギー (遅延型アレルギー) に分類され、原因となる化学物質 (アレルゲン) と接触後、24～48時間をピークとする炎症反応を生じる。臨床的にはアレルギー性接触皮膚炎といい、職業性皮膚疾患の約6割を占めるとも言われている<sup>4)</sup>。職業性アレルギー性接触皮膚炎の原因として報告例の多い物質には、ニッケル、コバルト、クロムなどの金属、エポキシ樹脂やアクリル樹脂、ゴム製品、毛染め液に含まれるパラフェニレンジアミンなどが知られている。

皮膚感作性は生命に関わる疾患ではないが、職業性では重症化や苦痛、不快感を回避するため職場の配置転換や転職を余儀なくされる場合があり、また消費者製品においては一度に多数の患者が発生する可能性があるなど、就労だけでなく社会生活にも大きな影響を与える。

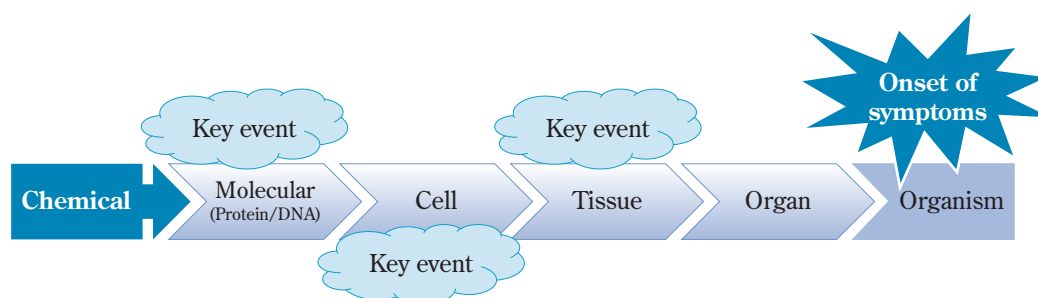
## (2) 皮膚感作性の発症機序

アレルギーは物質に対する反応性を準備・獲得する「感作」の段階と、アレルギー症状を発症させる「惹起」に至る二つの段階が知られている。皮膚感作性の場合、化学物質が繰り返し皮膚を透過して体内に侵入することにより、その化学物質に特異的に

反応するTリンパ球が体内で増えて見張り役となることで「感作」が成立し、再度、同じ化学物質が皮膚を透過して侵入してくることで、体内に分布しているその化学物質の見張り役であるTリンパ球からさまざまなサイトカインが放出され接触部位に炎症 (かぶれ) を惹き起こす (「惹起」)。

皮膚感作の発症機序を考える上で、その有害性発現経路 (Adverse Outcome Pathway: AOP) を理解する必要がある (Fig. 1)。AOPとは、化学物質が惹き起こす有害事象に対して、分子レベル、細胞レベル、組織レベル、個体レベルの各階層で認められる個々の重要事象 (Key event: KE) を結び付けて有害事象発現までの経路として示したものであり、皮膚感作性のAOPは2012年にOECDガイダンス文書として公表されている<sup>5)</sup>。

皮膚感作性の「感作」の段階は、そのAOPに基づく四つの事象 (KE) を経て成立する (Fig. 2)。KE1では、化学物質が皮膚を透過して表皮内のタンパク質と結合する。正常な皮膚にはバリア機能があり、分子量が1,000以上の化学物質は皮膚を透過できないため、皮膚感作性を示すアレルゲン (抗原) は、ほとんどが低分子化合物である。低分子化合物はタンパク質と結合することで完全抗原となり、抗原性を示す。次に、KE2では、角化細胞 (Keratinocytes) が活性化する。タンパク質と結合した化学物質が皮膚を透過する際、皮膚の表皮層の90%を占める角化細胞が、その化学物質による傷害から細胞を保護するため活性化されて炎症反応を惹起し、樹状細胞 (Dendritic cells: DC) が炎症反応に応答する。KE3ではDCが活性化する。抗原は、皮

**Fig. 1** A concept of Adverse Outcome Pathway (AOP)

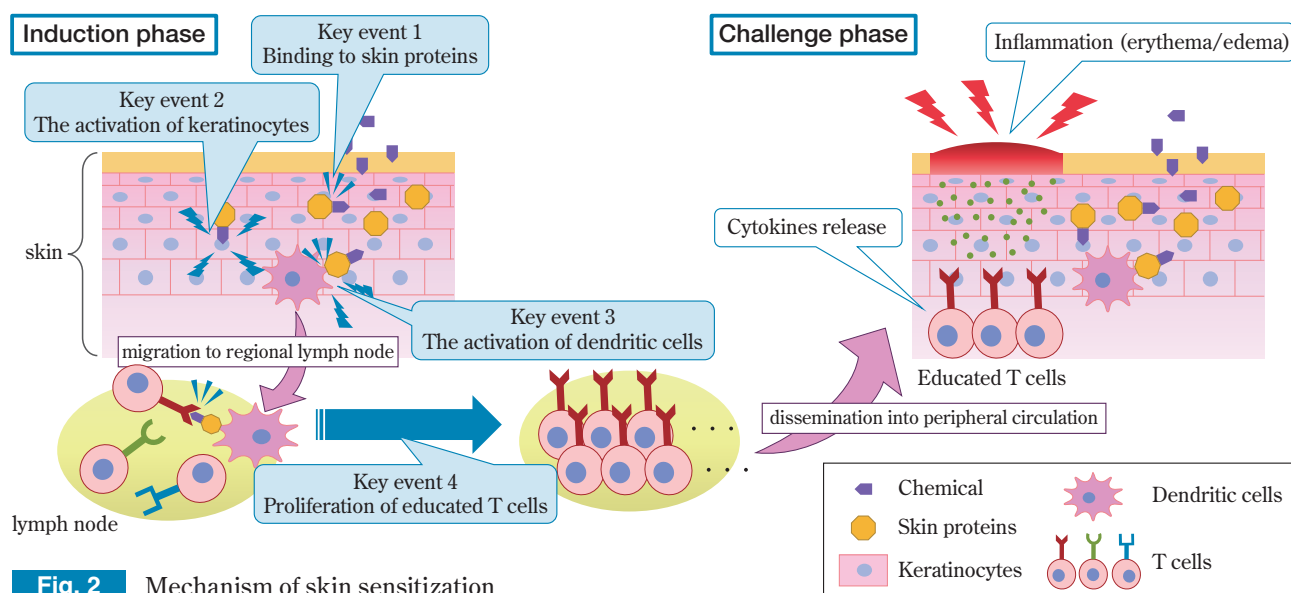


Fig. 2 Mechanism of skin sensitization

膚の表皮層あるいは真皮層に存在するDCに捕捉され、活性化したDCとともに近傍のリンパ節に運ばれる。KE4ではTリンパ球が活性化して増殖する。リンパ節中の未成熟なTリンパ球は、DCにより提示された抗原を認識して活性化することで、抗原特異的なT細胞へと分化・成熟・増殖する。特定の抗原に対する見張り役として全身を循環することで、「感作」が成立する。

### (3) 代表的な動物を用いた皮膚感作性評価手法

化学物質の皮膚感作性を評価する試験法開発の歴史は古く、1940年代よりヒトおよび動物を用いる数多くの試験法が報告されている。

代表的な動物を用いた皮膚感作性試験として、OECDテストガイドライン (TG) に収載されている皮膚反応を指標とするモルモットを用いたマキシマイゼーション法およびビューラー法 (TG406)<sup>6)</sup>、Tリンパ球の増殖を指標とするマウスを用いた局所リンパ節試験 (TG429)<sup>7)</sup>がある。これら3種類の試験法について、その概略を示す。

#### ① モルモット／マキシマイゼーション法

(Guinea Pig Maximization Test: GPMT)

MagnussonとKligmanにより1969年に開発され<sup>8)</sup>広く普及した試験法である。免疫応答を増強する賦活剤 (Freund's complete adjuvant: FCA) とともに被験物質を皮内注射し、刺激性のない被験物質にはラウリル硫酸ナトリウムを塗布するなどして検出感度を高めた試験系である。

モルモットの頸背部にFCAと被験物質を皮内注射し (一次感作)、1週間後に被験物質を経皮的に48時間閉塞貼付して感作する (二次感作)。二次感作の2週間後、側腹部に被験物質を24時間閉塞貼付して皮

膚反応を惹起する。惹起終了後24および48時間に貼付部位の皮膚反応 (紅斑、浮腫) を観察し、明らかな皮膚反応が認められた場合に陽性と判定する。

#### ② モルモット／ビューラー法 (Buehler Test)

Buehlerにより1965年に開発された試験法<sup>9)</sup>である。被験物質は感作から惹起まで全て経皮経路で適用し、FCAを用いないことから、実際のヒトの曝露条件に近い評価法と考えられており、FCAを用いたGPMTの結果次第では、より実場面に即した評価を目的として実施されることもある。

モルモットの側腹部に被験物質を週1回、6時間閉塞貼付し、これを同じ部位に計3回行って感作する。最終感作の2週間後、感作した部位と反対側の側腹部に被験物質を6時間閉塞貼付して惹起する。観察および判定方法については、GPMTと同様である。

#### ③ マウス／局所リンパ節試験

(Local Lymph Node Assay: LLNA)

Kimberらにより1986年に開発された試験法<sup>10)</sup>である。感作時のTリンパ球の増殖反応 (KE4) を放射性物質で標識されたトリチウム化チミジンのTリンパ球のDNAへの取り込みで評価する。

マウスの両耳介に被験物質を1日1回、3日間連続で塗布し、最終塗布3日後にトリチウム化チミジンを尾静脈内投与し、耳介リンパ節を摘出する。被験物質を塗布した群と媒体のみを塗布した対照群の放射活性の比をStimulation Index (SI) 値として算出し、濃度に依存した増加が認められ、かつSI値が3以上の場合に陽性と判定する。また、SI値が3を示す被験物質濃度 (EC3値) を皮膚感作性の強さの指標とすることができる (Fig. 3)。

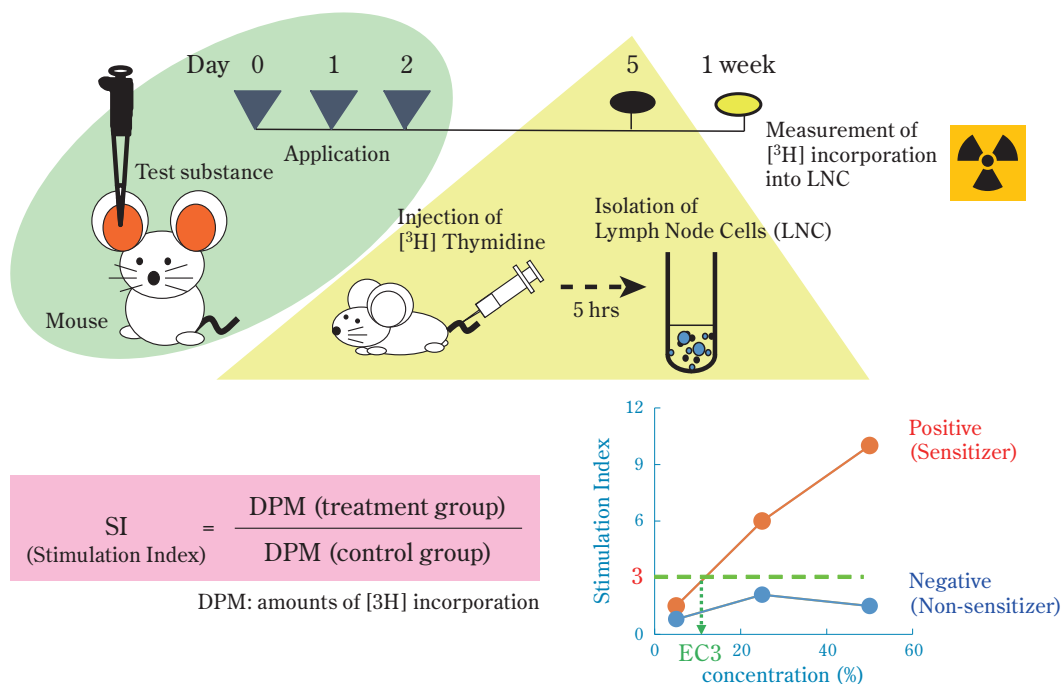


Fig. 3 Local Lymph Node Assay (LLNA)

本試験法は、モルモットを用いた試験と比較して定量的評価が可能で、使用する動物数が少なくFCAを用いないことから動物への苦痛が軽減され、皮膚反応の観察が困難な着色性物質を評価可能なことなどから、国際的に推奨されている。しかし、一部の金属に対して偽陰性（ヒトにおいて皮膚感作性を示すが、試験では陰性の結果）、あるいは刺激性物質に対して偽陽性（ヒトにおいて皮膚感作性を示さないが、試験では陽性の結果）を示すことがあり、適用範囲に制限のあることも知られている。

また、放射性物質を用いるため施設や設備などの制約があり、放射性物質を用いない改良法としてAdenosine triphosphate (ATP) や5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を用いる方法が2010年にTG442A (LLNA-DA)<sup>11)</sup>およびTG442B (LLNA-BrdU-ELISA or FCM)<sup>12)</sup>として、OECD TGに収載されている。当社はLLNA-DAのバリデーション試験に参画し、ガイドライン化に寄与した。

## 2. 皮膚感作性評価の最近の動向

### (1) 各地域（日本、米国、欧州）の登録要件

農薬、防疫薬、一般化学品の登録申請において、皮膚感作性評価には各地域で若干の違いがあるため、Table 2に日米欧三極の登録要件についてまとめた。

※1 薬機法：医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律

※2 化審法：化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律

※3 安衛法：労働安全衛生法

いずれの地域においても、動物実験主体から動物を用いない代替法の活用へ転換する流れにある。

### ① 日本

使用用途によって規制する管轄省庁が分かれており、農作物に使用する農薬は農薬取締法（農林水産省）、農薬以外の殺虫剤などの防疫薬は薬機法<sup>※1</sup>（厚生労働省）、一般化学薬品は化審法<sup>※2</sup>（経済産業省・厚生労働省・環境省）および安衛法<sup>※3</sup>（厚生労働省）により規制されている。

農薬は有効成分である原体と実際の製品である製剤に分けられるが、皮膚感作性の評価法としては、原体はGPMT、製剤はBuehler Testが推奨されてきた<sup>13)</sup>。しかしながら、「農薬の登録申請において提出すべき資料について」の改正に伴い、農薬原体に対してはOECD TGに収載された動物実験代替法の使用が認められるようになった<sup>14)</sup>。

防疫薬の中で医薬品に指定されているものは、「医薬品毒性試験法ガイドライン」においてGPMTなどのFCAを使用する試験法が推奨されている<sup>15)</sup>。剤型や有効成分により、医薬部外品に指定されているものもある。従来、医薬部外品は医薬品に準じてモルモットを用いた試験またはLLNAの実施が適当であるとされていたが<sup>16)</sup>、2018年に「医薬部外品・化粧品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」が作成され、動物を用いない代替法試験の実施も可能となった（詳細は2. (2) ⑤に記載<sup>17)</sup>）。

一般化学品の化審法および安衛法においては、新



規物質届出の際に皮膚感作性は必須項目ではなく、試験法も定められていない。

## ② 米国

米国では、使用する対象が農作物であるかどうかに関わらず、殺菌剤・除草剤・殺虫剤・殺鼠剤など（Pesticide）は一括して米国環境保護庁（United States Environmental Protection Agency: US EPA）が所管しており、米国連邦殺虫剤殺菌剤殺鼠剤法（The Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act: FIFRA）によって規制されている。Pesticideの登録では原体、製剤ともに皮膚感作性データは通常必須の項目である。EPAガイドラインには、LLNA、GPMT、Buehler Testが選択肢として挙げられているが、LLNAを第一選択の試験として推奨している<sup>18)</sup>。一方、動物実験代替法の活用も検討されており、原体や不活性成分などの単一物質については代替法を組み合わせたデータを提出可能とする暫定方針案が2018年4月に公開された<sup>19)</sup>。暫定ではあるものの、登録業務を行うUS EPA農薬プログラム部（Office of Pesticide Programs）は、この方針案に示された方法に従った評価結果であれば、速やかにデータを受け入れるとしており、積極的に代替化を進める意向がうかがえる。

一般化学品も同様にUS EPAが所管しており、有害物質規制法（Toxic Substances Control Act: TSCA）により規制されている。一般化学品の登録では、申請時のデータ提出は必須ではないものの、当局審査

によりリスク評価のために情報が必要と判断された場合にデータ提出を求められる。

## ③ 欧州

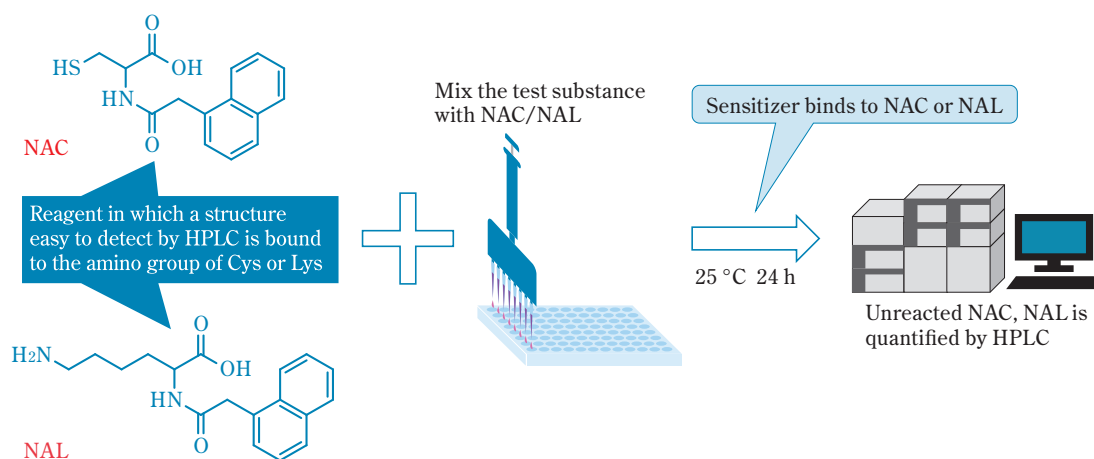
農薬は植物保護製品（Plant Protection Products: PPP）として欧州食品安全庁（Europe Food Safety Agency: EFSA）が所管し、植物保護製品規則（1107/2009）により規制されている。原体については、欧州委員会（EC）に一括申請するのに対し、製剤はEUの北部・中部・南部の三地域のうち実際に販売する地域の各国当局への申請が必要となる。データ要求項目は1107/2009の下位法令である委員会規則283/2013（原体）および284/2013（製剤）で定められている。いずれの委員会規則にも、LLNAの実施が第一選択であり、LLNAが実施できない場合のみ正当性を示した上でGPMTの実施が認められると記載されている<sup>20), 21)</sup>。一方、防疫薬は、殺生物性製品（Biocidal Product）として欧州化学品庁（European Chemicals Agency: ECHA）が所管し、殺生物性製品規則（528/2012）により規制されている<sup>22)</sup>。まず利用可能なデータを評価し、評価できなかった場合は動物を用いた試験（*in vivo*試験）を実施するが、PPPと同様にLLNAが第一選択であり、それ以外の試験法を選択した場合は正当性を示す必要がある。

一般化学品はECHAに所管されており、REACH規則により規制されている。REACHでは、年間1トン以上製造・輸入される化学物質に対して登録が必要

**Table 2** Skin sensitization test acceptability for registration of chemicals in Japan, US and EU

| Region | Chemical class                              | Regulating authority | Regulation Act                     | Acceptability     |                        |                        |
|--------|---------------------------------------------|----------------------|------------------------------------|-------------------|------------------------|------------------------|
|        |                                             |                      |                                    | GPMT/Buehler      | LLNA                   | Non-animal test method |
| Japan  | Agricultural chemicals                      | MAFF                 | Agricultural Chemicals Control Act | ○                 | ○                      | ○                      |
|        | Insecticides for infectious disease control | MHLW                 | PMD Act                            | ○                 | ○<br>(quasi drug only) | ○<br>(quasi drug only) |
|        | Industrial chemicals                        | MHLW<br>METI<br>MOE  | JCSCA<br>ISHA                      | ← Not necessary → |                        |                        |
| US     | Pesticides                                  | US EPA (OPP)         | FIFRA                              | ○                 | ◎                      | ○                      |
|        | Industrial chemicals                        | US EPA (OPPT)        | TSCA                               | ← Not necessary → |                        |                        |
| EU     | Plant protection products                   | EFSA                 | PPPR<br>(1107/2009)                | ○                 | ◎                      | —                      |
|        | Biocidal products                           | ECHA                 | BPR<br>(528/2012)                  | ○                 | ◎                      | —                      |
|        | Industrial chemicals                        | ECHA                 | REACH<br>(1907/2006)               | ○                 | ○                      | ◎                      |

○: acceptable; ◎: high priority method; —: not listed; MAFF: Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries; MHLW: Ministry of Health, Labour and Welfare; PMD Act: Pharmaceutical and Medical Device Act; METI: Ministry of Economy, Trade and Industry; MOE: Ministry of the Environment; JCSCA: Japanese Chemical Substances Control Act; ISHA: Industrial Safety and Health Act; OPP: Office of Pesticide Programs; OPPT: Office of Pollution Prevention and Toxics; PPPR: Plant Protection Products Regulation; BPR: Biocidal Products Regulation; REACH: Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals



**Fig. 4** Method of ADRA

Key event 1 can be addressed using ADRA. Key event 1 is the covalent binding of electrophilic substances to nucleophilic centers in skin proteins.

であり、年間1～10、10～100、100～1,000、1,000トン以上のトン数帯ごとに要求される毒性試験が異なる。皮膚感作性は全てのトン数帯で評価することが要求され、動物実験代替法による評価が困難な場合のみ、*in vivo*試験が実施可能である。*In vivo*試験は農薬・防疫薬と同様にLLNAが第一選択であり、それ以外の試験法を選択した場合は正当性を示す必要がある<sup>23)</sup>。

## (2) 動物実験代替法の開発状況

欧州で2003年に公布された「EU化粧品指令第7次改正 (2003/15/EC)」は、化粧品開発における動物実験を段階的に廃止し、2013年以降、動物実験が実施された化粧品（原料を含む）のEU域内での販売を禁止するものであったが、化粧品業界に限らず、世界中の各業界に動物実験代替法の開発を加速させるきっかけとなった<sup>24)</sup>。その流れは上述の通り、各国の規制に大きく影響している。

毒性影響の中でも特に皮膚感作性は作用機序の解明が進んでおり、上述のAOPにおけるKE1～KE3に対応した動物を用いない試験法が次々に開発されている。OECD TGに既に収載されている各KEの代表的な評価法を中心に紹介するとともに、毒性予測手法 (*in silico*手法) やこれらを組み合わせた評価法について、最近の動向を以下にまとめた。

### ① KE1 (タンパク質との共有結合)

分子量が小さい低分子化合物は、生体内のタンパク質のアミノ酸残基（特にシステイン (Cys) やリジン (Lys) など）と共有結合することで完全抗原となる。この化学物質とタンパク質との結合を評価する試験法として開発されたDirect Peptide Reactivity Assay (DPRA) は、2015年にKE1の評価法として

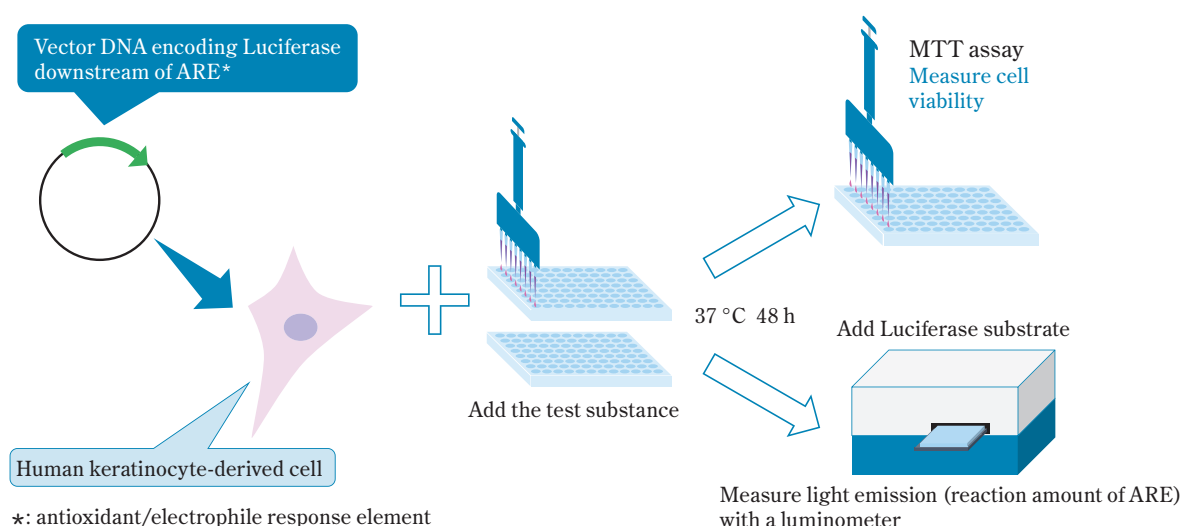
OECD TG442Cに収載された。最近、富士フイルム株式会社がDPRAの改良法であるAmino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) を考案し、当社もバリデーション試験に参画して2019年6月にOECD TG442Cへ追加収載された<sup>25)</sup>。

DPRAは、生体内タンパク質の代わりにCysあるいはLysを含有する二つの合成ペプチドを用いる試験である。被験物質を24時間反応させた後、HPLCで未反応ペプチドを測定することにより、タンパク質との結合能を評価し、定性および定量評価が可能である。判定基準として、CysおよびLysのペプチドの減少率の平均値が6.38%以下の場合には陰性、6.38%より大きい場合を陽性と判定する。また、減少率が6.38%より大きく22.52%未満の場合には低い反応性、22.52%より大きく42.47%未満の場合には中程度、42.47%より大きい場合は高い反応性と、陽性の程度を三つに分類することもできる<sup>26), 27)</sup>。

ADRAは、DPRAと同様の原理で、合成ペプチドの代わりにCysあるいはLysにUV吸収の強いナフタレン環を付加した*N*-アセチルシステイン (NAC) および*N*-アセチルリジン (NAL) を用いることにより、検出感度を高めた試験法である。被験物質を25 °Cで24時間反応させた後、HPLCで未反応のNACおよびNALを測定し、それぞれの減少率の平均値が4.9%以上の場合に陽性と判定する。検出感度が高いためDPRAより低濃度で反応させることができ、被験物質の少量化や難溶性物質への適用範囲拡大などの長所を有する (Fig. 4)<sup>28)</sup>。

### ② KE2 (角化細胞の活性化)

化学物質が皮膚を透過する際、角化細胞を刺激し、炎症反応を惹き起こすなど、角化細胞の特定の細胞



**Fig. 5** Method of KeratinoSens

Key event 2 can be addressed using KeratinoSens. Key event 2 is gene expression changes or inflammatory responses associated with specific cell signaling pathways such as ARE-dependent pathways in the keratinocytes.

内シグナル伝達経路を活性化する。多くの皮膚感作性物質は、「感作」が成立するまでに角化細胞内の抗酸化剤応答配列 (ARE) により制御される遺伝子群を誘導することが報告されているが、特にNrf2-Keap1-ARE経路を活性化するとされている。Nrf2は通常、その抑制因子であるKeap1と結合して不活化状態にあるが、Keap1のシステイン残基に皮膚感作性物質などの求電子性の物質が結合すると、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の細胞保護に働く。代表的な試験法としてKeratinoSens法およびLuSens法が、それぞれ2015年および2018年にOECD TG442Dに収載された<sup>29)</sup>。いずれの試験法もヒト角化細胞由来株細胞を用いて、ARE下流に導入したルシフェラーゼの発光量を基に評価する。細胞生存率が70%以上かつコントロールに比べて1.5倍以上の発現誘導がみられる場合に陽性と判定する (Fig. 5)。

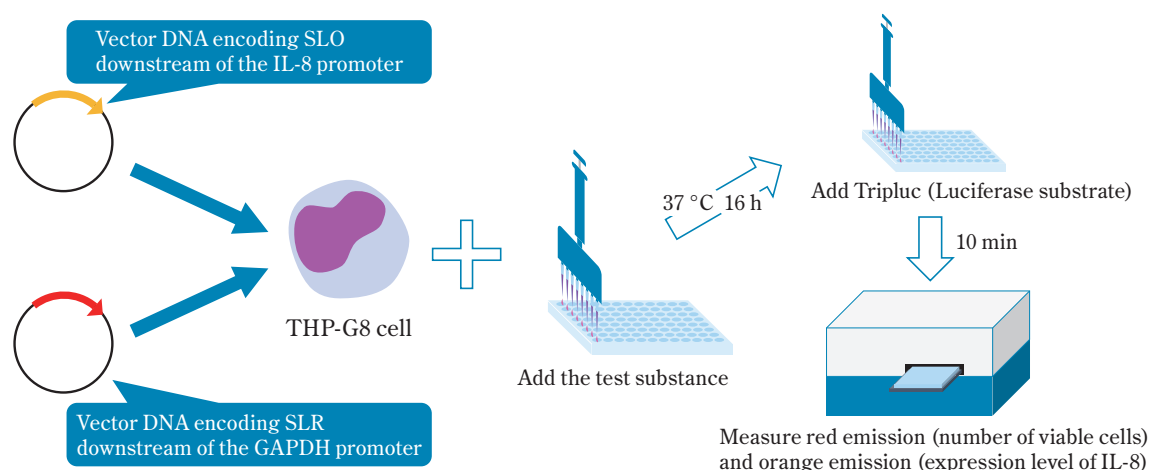
### ③ KE3 (樹状細胞の活性化)

樹状細胞 (DC) は皮膚感作性物質そのもの、あるいは角化細胞から放出されたサイトカインやインターロイキンによって刺激され、活性化する。活性化したDCは種々のシグナル物質 (サイトカイン、ケモカイン) を産生する。また、活性化したDCは抗原を貪食し、その抗原特有の構造を認識して細胞表面上に存在する主要組織適応性複合体 (major histocompatibility complex: MHC) 上に抗原として提示することで、抗原特異的なT細胞を活性化する。このように活性化したDCでは、抗原提示に必要な共刺激分子である細胞

表面分子CD86やCD54の発現上昇や周辺細胞へのシグナル物質 (インターロイキン-8 (IL-8) など) の産生など、形態的および機能的変化を生じることが知られている<sup>30), 31)</sup>。これらの変化を検出する代表的な方法として、ヒト細胞株活性化試験 (h-CLAT)、U937細胞株活性化試験 (U-SENS) およびIL-8レポーター遺伝子アッセイ (IL-8 Luc Assay) が、2016~18年に相次いでOECD TG 442Eに収載された<sup>32)</sup>。当社はIL-8 Luc Assayのバリデーション試験に参画し、ガイドライン化に寄与した。

h-CLATはDCの代わりにヒト単球系培養細胞であるTHP-1細胞を用い、CD86およびCD54の発現を指標とする方法である。被験物質を添加後24時間に蛍光染色したCD86およびCD54の発現量をフローサイトメトリーにより測定し、被験物質無処理細胞に対する相対蛍光強度 (Relative Fluorescence Intensity: RFI) で評価する。判定基準は、細胞生存率が50%以上かつCD86およびCD54のRFIがそれぞれ150%および200%以上となる結果が2回得られた場合に陽性と判定する。また、陽性と判定される最小被験物質濃度 (MIT) を用いて、MITが10 µg/mL未満を強い皮膚感作性物質、10~5,000 µg/mLを弱い皮膚感作性物質とするなど、定量的な評価への利用も検討されている<sup>33), 34)</sup>。

U-SENSはh-CLATと同様、DCの代わりにヒト組織球形リンパ腫細胞株であるU937細胞を用いたCD86の発現を指標とする方法である<sup>35)</sup>。被験物質を添加後45時間に、CD86の陽性細胞率を被験物質無処理群との比、Stimulation Index (SI) で評価する。判定基準は、細胞生存率が70%以上かつSIが150%以上となる



**Fig. 6** Method of IL-8 Luc Assay

Key event 3 can be addressed using IL-8 Luc Assay. Key event 3 is the activation of dendritic cells, typically assessed by expression of specific cell surface markers, chemokines and cytokines.

結果が2回得られた場合に陽性と判定する。

IL-8 Luc Assayは、前述の二つの方法と異なりIL-8の発現を指標とする<sup>36)</sup>。細胞はTHP-G8細胞（THP-1細胞にIL-8およびGAPDHプロモーター配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子であるStable luciferase orange (SLO) およびStable luciferase red (SLR) をそれぞれ組み込んだベクターDNAを導入した細胞）を用いる。GAPDHは定常的に発現するハウスキーピング遺伝子で目的遺伝子の相対的発現量の変化を算出するための指標に用いられる。被験物質を添加後16時間にSLOおよびSLRの基質を添加し、ルミノメーターで発光強度を測定する。GAPDHとIL-8の発現の比が溶媒対照群と比べて1.4倍以上増加した場合に陽性と判定する。試験を繰り返し実施し、陽性の結果が2回得られた場合に陽性、陰性の結果が3回得られた場合に陰性と判定する (Fig. 6)。

#### ④ 皮膚感作性予測 (*in silico*法)

化学物質の物理化学的性質や類似化合物の情報から毒性を予測する手法は、古くから遺伝毒性を中心に検討されてきたが、昨今の動物実験削減の要請や

コンピューター技術の発達により、その対象が局所影響である刺激性や皮膚感作性など毒性全般に広がりつつある。物理化学的性質としては、基本情報である分子量、オクタノール/水分配係数に限らず、物質の構造に起因する電子状態など多様な記述子を利用し、データベース化した大量の情報を解析することにより新規物質の毒性予測を行う。

毒性予測ツールには、統計ベースと知識ベースの二つのツールがある (Table 3)。統計ベースは、参照化合物のデータセットから導出された数理モデルを用いる手法で、化学構造と活性（毒性）の相関を部分構造・物性・電子の極性などから解析する定量的構造活性相関 (Quantitative Structure Activity Relationship: QSAR) に基づいている。統計ベースの代表的なモデルとしては、VEGA、CASE Ultra、TOPKATなどが知られている。一方、知識ベースは構造的ルールやアラートを用いる手法で、文献などの既知情報や専門家によるデータ解析により導出される。構造アラートは毒性影響やメカニズムに関与する部分構造と定義される。知識ベースの代表的なモデルとしては、ToxtreeやDerek Nexusなどが知られている。

**Table 3** Summary of *in silico* tools

| In silico Model   | Builders       | Characterization  |                   | Freely available software |
|-------------------|----------------|-------------------|-------------------|---------------------------|
|                   |                | Statistical-based | Expert rule-based |                           |
| OECD QSAR Toolbox | OECD           | ✓                 | ✓                 | ✓                         |
| Toxtree           | JRC            |                   | ✓                 | ✓                         |
| VEGA              | Caesar project | ✓                 |                   | ✓                         |
| CASE Ultra        | MultiCASE      | ✓                 |                   |                           |
| Derek Nexus       | Lhasa          |                   | ✓                 |                           |
| TIMES-SS          | LMC            | ✓                 | ✓                 |                           |
| TOPKAT            | Accelrys       | ✓                 |                   |                           |



なお、無償（OECD QSAR Toolbox、Toxtree、VEGA）と有償（CASE Ultra、Derek Nexus、TIMES-SS、TOPKAT）のモデルが存在するが、有償モデルでは皮膚における代謝物を考慮した皮膚感作性予測を備えるなど、無償モデルより機能が充実している。

#### ⑤ 動物実験代替法の組み合わせ評価

皮膚感作性は複雑な免疫反応であるため、単一のKEを評価する代替法のみでは評価困難とされている。そのため、KE1のタンパク質との結合能確認のような*in chemico*法やKE2およびKE3のような細胞を用いた*in vitro*法といった簡易評価系だけでなく、化学物質の物理化学的指標やコンピューター解析による*in silico*法を用いて得られた結果を組み合わせた包括的な評価法が重要視されている。

近年、*in chemico*および*in vitro*の実験結果や*in silico*の予測データを組み合わせる手法として、Defined Approach（DA）が注目されている。DAは有用性と妥当性が検証されたガイドライン試験などのデータを組み合わせ、予測性や適用限界などを見極めた明確なルール（Data Interpretation Procedure: DIP）に基づき、専門家判断を介することのない客観性に優れた評価手法である。2016年にOECDはガイダンスドキュメントを作成し、12のケーススタディを紹介している<sup>37)</sup>（Table 4）。

2018年に、規制当局として初めてUS EPAより皮膚感作性の定性評価（陽性/陰性判定）を目的とした以下の2種類のDA案が示された<sup>19)</sup>（Fig. 7, 8）。

- (a) BASF社から提案された“2 out of 3 approach”をベースとしたもので、KE1～KE3のうち異なるKEの任意の2試験を実施して、結果が一致した場合はその結果を最終評価とし、結果が異なった場合は、未実施のKEの試験を実施して、2試験で一致した結果を最終評価として採用する（Fig. 7）。

- (b) 花王株式会社から提案された“Sequential Testing Strategy（STS）”をベースとしたもので、最初にKE3の試験を実施し、その結果が陽性であれば陽性と結論し、陰性の場合、さらにKE1の試験を実施し、その結果が陽性であれば最終評価は陽性、陰性であれば最終評価は陰性と結論する

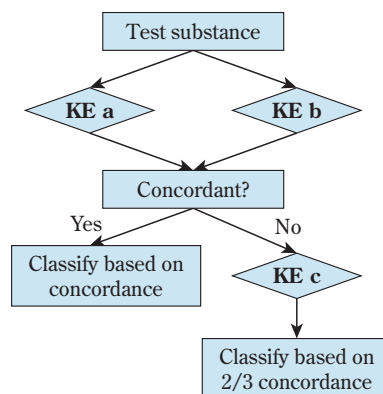


Fig. 7 Defined Approach: “2 out of 3 approach” (US EPA)

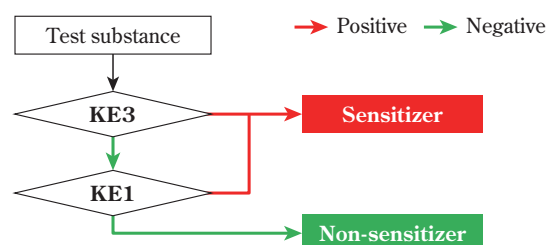


Fig. 8 Defined Approach: “Sequential Testing Strategy” (US EPA)

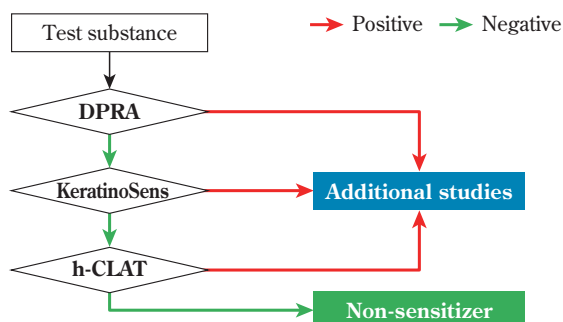
Table 4 Case study of defined approach

|    | Case study                                                                                                                 | Proposer     | Purpose               |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------------------|
| 1  | An AOP-based “2 out of 3” integrated testing strategy approach to skin hazard identification                               | BASF         | Hazard identification |
| 2  | Sequential Testing Strategy for hazard identification of skin sensitizers                                                  | RIVM         |                       |
| 3  | A non-testing Pipeline approach for skin sensitisation                                                                     | G. Patlewicz |                       |
| 4  | Stacking meta-model for skin sensitization hazard identification                                                           | L’Oreal      |                       |
| 5  | Integrated decision strategy for skin sensitization hazard                                                                 | ICCVAM       |                       |
| 6  | Consensus of classification trees for skin sensitization hazard prediction                                                 | EC-JRC       |                       |
| 7  | Sensitizer potency prediction based on Key event 1+2: Combination of kinetic peptide reactivity data and KeratinoSens data | Givaudan     | Potency prediction    |
| 8  | The artificial neural network model for predicting LLNA EC3                                                                | Shiseido     |                       |
| 9  | Baysian Network DIP for hazard and potency identification of skin sensitizers                                              | P&G          |                       |
| 10 | STS for sensitizing potency classification based on <i>in chemico</i> and <i>in vitro</i> data                             | Kao          |                       |
| 11 | ITS for sensitizing potency classification based on <i>in silico</i> , <i>in chemico</i> and <i>in vitro</i> data          | Kao          |                       |
| 12 | DIP for skin allergy risk assessment (SARA)                                                                                | Unilever     |                       |

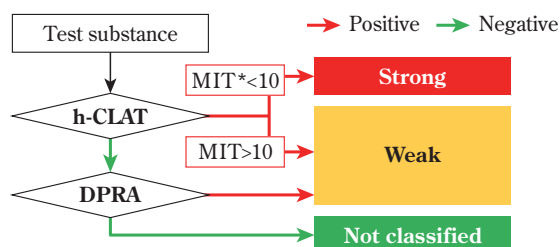
(Fig. 8)。(a)と同様に、各KEに対応する試験であれば試験種の指定はない。

わが国でも2018年に厚生労働省より医薬部外品・化粧品の陰性判定法として“ボトムアップ3 out of 3”が示され、それぞれKE1～KE3に該当するDPRA、KeratinoSensおよびh-CLATでいずれも陰性の場合のみ、評価物質は陰性と判定される<sup>17)</sup> (Fig. 9)。

OECDではDAのガイドライン化を目指す動きがあり、定性評価法にはUS EPAと同じ“2 out of 3 approach”が、定量評価法（皮膚感作性の強さの評



**Fig. 9** Defined Approach: “Bottom up 3 out of 3 approach” (JP MHLW)



★: Minimum induction threshold (μg/mL)

**Fig. 10** Defined Approach: “KE 3/1 Sequential Testing Strategy” (OECD)

| Score | h-CLAT MIT (μg/mL) | DPRA depletion (%) | OECD QSAR toolbox |
|-------|--------------------|--------------------|-------------------|
| 3     | ≤10                | ≥42.47             | —                 |
| 2     | >10, ≤150          | ≥22.62, <42.47     | —                 |
| 1     | >150, ≤5000        | ≥6.376, <22.62     | Sensitiser        |
| 0     | Not calculated     | <6.376             | Non sensitiser    |

Total battery score

|           |             |                      |
|-----------|-------------|----------------------|
| 7: Strong | 2 ~ 6: Weak | 0, 1: Not classified |
|-----------|-------------|----------------------|

**Fig. 11** Defined Approach: “KE 3/1 Integrated Testing Strategy” (OECD)

価法) には、STSと同じく花王株式会社からの提案である“Integrated Testing Strategy (ITS)”の二つの評価法がドラフト案として提案され、評価結果より三つの区分（強い感作性、弱い感作性、感作性なし）に判定される<sup>38)</sup>。STSでは実施可能な試験種がKE3はh-CLAT、KE1はDPRAに指定されている。h-CLATが陽性で、得られたMIT（陽性と判定される最小濃度）が10 μg/mL未満であれば強い感作性、10 μg/mLより高い場合は弱い感作性と判定する。h-CLATが陰性の場合にはDPRAを実施し、陽性であれば弱い感作性、陰性であれば感作性なしと判定する (Fig. 10)。ITSでは、KE1のDPRA、KE3のh-CLATの実施に加え、*in silico*ツールにはOECD QSAR Toolboxが推奨されている。それぞれの結果を0～3にスコア化し、その合計点が7であれば強い感作性、2～6であれば弱い感作性、0または1であれば感作性なしと判定する (Fig. 11)。なお、GHS分類<sup>1)</sup>との整合性も現在検討が進められている。

## 当社における皮膚感作性の動物実験代替法への取り組み

当社では、2005年頃から皮膚感作性の簡易評価法として社内取り扱い物質を中心にグルタチオン（グルタミン酸、システイン、グリシンから成るペプチド）との結合性評価を実施してきた<sup>39), 40)</sup>。これはKE1に相当する試験系であるが、DPRAやADRAのように基質の減少率による判定ではなく、生成する基質（グルタチオン）との結合物をLC/MSで検出する方法である。しかしながら、他のKE1の試験と同様に、単一の代替法試験のみの評価では検出力に限界があり、また、動物を用いた手法のように皮膚感作性の強さまでは判定できないという課題もある。

作業者安全の観点では、開発初期の研究レベルの合成において、取り扱う原料や中間体を含めて皮膚感作性が未評価の化学物質は多く、これらを動物実験なしに簡易的にかつ、短期間に評価できる手法の開発が望まれている。さらに、陽性あるいは陰性を評価するだけでなく、低濃度でもヒトでかぶれを起こすような強い感作性物質を判別できる手法を開発できれば、取り扱い物質の代替検討や保護具対策を速やかに進めることができ、かぶれ事故を未然に防ぐことができる。

現在、当社ではバリデーション試験を通じて技術導入した試験法を活用し、*in silico*ツールとしてDerek NexusおよびOECD QSAR Toolbox、KE1としてDPRAおよびADRA、KE2としてLuSens法、KE3としてIL-8 Luc assayを適切に組み合わせることにより、簡便で精度の高い評価法を目指して検討中である。

## 今後の展望

皮膚感作性はAOPが解明されている数少ない毒性の一つであり、近年の世界的な動物実験削減を求める社会的風潮の高まりとともに、新しい動物実験代替法が次々に考案されている。最近では200個の関連遺伝子の変動を機械学習で解析するGARD (Genomic Allergen Rapid Detection) assayが注目されている他、OECDへの収載を目指して複数の試験の検証作業が進められている<sup>41)</sup>。

先述の通り、新規試験法の開発や組み合わせ評価の提案が精力的に進められているが、動物実験の代替化には予測精度や化学物質の適用範囲などいくつかの課題があり、解決に向けて検討が進められている。

### 1. 感作性の強さの予測について

皮膚感作性の評価は陽性/陰性の区分だけではなく、感作性の強さも作業者安全の観点で重要な情報である。先述の通り、OECDで提案されているSTSおよびITSの組み合わせ評価法は、二段階のみではあるが感作性の強さの分類が可能な手法である。今後、より精緻に感作性の強さを予測するために、感作性の強弱に応じて多段階に判別できる評価法の開発が求められている。

### 2. 溶解性の問題について

培養細胞の実験系 (*in vitro*法) では、疎水性の高い難水溶性物質への適用が困難という共通の課題がある。皮膚刺激性評価では、難水溶性物質の評価に適した三次元培養の再構築ヒト表皮モデルを用いた試験系が既にOECD TGに収載されている (TG439)<sup>42)</sup>。本試験は、化合物を培養液に溶解させることなく培養表皮上に直接添加して細胞の生存率で評価する方法である。このモデルを皮膚感作性評価に応用し、表層の角化細胞中の関連遺伝子の発現変動を指標とした評価法が開発され、現在ガイドライン化を目指している (EpiSensA、SENS-IS assay)<sup>43), 44)</sup>。

### 3. 代謝など構造変換について

化学物質が皮膚を透過後に代謝を受けて反応性を示す「プロハプテン」や自動酸化などにより反応性を示す「プレハプテン」の評価に適した試験法がなく、適切な前処理法の開発や代謝予測機能を備えた *in silico* 手法の活用などが期待される。

現時点であらゆる化学物質を動物実験代替法に完全に置換することには課題も残されているが、既に開発された試験法および開発途上の試験の特徴や適用範囲を見極め、複数の試験法を組み合わせで評価

するなど幅広い知識・技術を習得することが求められる。今後も新規に開発された動物実験代替法を積極的に導入しつつ、*in silico*、*in chemico*および*in vitro*の各々の特徴を生かして、皮膚感作性の強さも考慮した簡易評価法の開発を目指し、当社製品および作業者の安全性向上ならびに動物実験の削減に貢献していきたい。

## 引用文献

- 1) “GLOBALLY HARMONIZED SYSTEM OF CLASSIFICATION AND LABELLING OF CHEMICALS (GHS), Seventh revised edition”, UNITED NATIONS New York and Geneva, (2017).
- 2) 厚生科学審議会疾病対策部会, “リウマチ・アレルギー対策委員会報告書 (平成23年8月)”, (2011).
- 3) P. G. H. Gell and R. R. A. Coombs, “Clinical Aspects of Immunology (Second edition)”, Blackwell Scientific Publications (1968), p. 575.
- 4) 高山 かおる, アレルギー・免疫, **24**(11), 1510 (2017).
- 5) OECD, “The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, ENV/JM/MONO (2012) 10/PART1” (2012).
- 6) OECD, “OECD Guidelines for testing of chemicals No. 406. Skin sensitisation” (1992).
- 7) OECD, “OECD Guidelines for testing of chemicals No. 429. Skin sensitisation: Local lymph node assay” (2010).
- 8) B. Magnusson and A. M. Kligman, *J. Invent. Dermatol.*, **52**, 268 (1969).
- 9) E. V. Buehler, *Arch. Dermatol.*, **91**, 171 (1965).
- 10) I. Kimber and D. A. Basketter, *Food Chem. Toxicol.*, **30**, 165 (1992).
- 11) OECD, “OECD Guidelines for testing of chemicals No. 442A. Skin sensitisation: Local lymph node assay: DA” (2010).
- 12) OECD, “OECD Guidelines for testing of chemicals No. 442B. Skin sensitisation: Local lymph node assay: BRDU-ELISA or FCM” (2018).
- 13) 農林水産省, “「農薬の登録申請に係る試験成績について」の運用について 3. 局長通知別添「農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針」について”, <https://www.acis.famic.go.jp/shinsei/3986/3986.pdf> (参照2019/4/8).
- 14) 農林水産省, “農薬の登録申請に係る試験成績について (30消安第6278号農林水産省消費・安全局長



- 通知) (別添)「農薬の登録申請において提出すべき資料について」, <https://www.acis.famic.go.jp/shinsei/6278.pdf> (参照2019/4/8).
- 15) 厚生労働省, “医薬品の製造 (輸入) 承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて (平成元年九月一日 (薬審一第二四号))”, <https://www.pmda.go.jp/files/000205438.pdf> (参照2019/4/8).
  - 16) 厚生労働省, “皮膚感作性試験代替法及び光毒性試験代替法を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンスについて (平成24年4月26日 事務連絡)”, <https://www.pmda.go.jp/files/000161377.pdf> (参照2019/4/8).
  - 17) 厚生労働省, “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について (平成30年1月11日薬生薬審発0111第1号)”, <https://www.pmda.go.jp/files/000222425.pdf> (参照2019/4/8).
  - 18) US EPA, “Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.2600 Skin Sensitization”, <https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPPT-2009-0156-0008> (参照2019/4/8).
  - 19) US EPA, “Interim Science Policy: Use of Alternative Approaches for Skin Sensitization as a Replacement for Laboratory Animal Testing DRAFT FOR PUBLIC COMMENT”, <https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPP-2016-0093-0090> (参照2019/4/8).
  - 20) EU, “COMMISSION REGULATION (EU) No 283/2013”, <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:093:0001:0084:EN:PDF> (参照2019/4/8).
  - 21) EU, “COMMISSION REGULATION (EU) No 284/2013”, <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:093:0085:0152:EN:PDF> (参照2019/4/8).
  - 22) EU, “REGULATION (EU) No 528/2012 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL”, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0528&from=EN> (参照2019/4/8).
  - 23) EU, “COMMISSION REGULATION (EU) No 2016/1688”, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R1688&from=EN> (参照2019/6/5).
  - 24) 本庄 萌, 一橋法学, **16**(3), 319 (2017).
  - 25) OECD, “OECD Guidelines for testing of chemicals No. 442C. Key-Event-Based Test Guideline For In Chemico Skin Sensitisation Assays Addressing The Adverse Outcome Pathway Key Event On Covalent Binding To Proteins” (2019).
  - 26) G. F. Gerberick *et al.*, *Toxicol. Sci.*, **81**, 332 (2004).
  - 27) G. F. Gerberick *et al.*, *Toxicol. Sci.*, **97**, 417 (2007).
  - 28) M. Fujita *et al.*, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **70**, 94 (2014).
  - 29) OECD, “OECD Guidelines for testing of chemicals No. 442D. *In vitro* skin sensitization assays addressing the key event on keratinocyte activation” (2018).
  - 30) H. Sakaguchi *et al.*, *Cell Biol. Toxicol.*, **25**, 109 (2009).
  - 31) Y. Nukada *et al.*, *J. Toxicol. Sci.*, **33**, 175 (2008).
  - 32) OECD, “OECD Guidelines for testing of chemicals No. 442E. *In vitro* skin sensitization assays addressing the key event on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitization” (2018).
  - 33) Y. Nukada *et al.*, *Toxicol. In Vitro*, **27**, 609 (2013).
  - 34) E. Corsini *et al.*, *Cosmetics*, **3**, 7 (2016).
  - 35) C. Piroird *et al.*, *Toxicol. In Vitro*, **29**(5), 901 (2015).
  - 36) T. Takahashi *et al.*, *Toxicol. Sci.*, **124**, 359 (2011).
  - 37) OECD, “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” (2016).
  - 38) OECD, “Supporting document for evaluation and review of draft guideline (GL) for defined approaches (DAs) for skin sensitisation”, [https://www.oecd.org/env/ehs/testing/latestdocuments/DAGL%20supporting%20document\\_8Oct2018\\_v2\\_Clean.pdf](https://www.oecd.org/env/ehs/testing/latestdocuments/DAGL%20supporting%20document_8Oct2018_v2_Clean.pdf) (参照2019/6/5).
  - 39) 太田 美佳 ほか, 住友化学, **2005-II**, 50 (2005).
  - 40) H. Kato *et al.*, *J. Toxicol. Sci.*, **28**(1), 19 (2002).
  - 41) H. Johansson *et al.*, *BMC Genomics*, **12**:399 (2011).
  - 42) OECD, “OECD Guidelines for testing of chemicals No. 439. *In vitro* skin irritation: Reconstructed human epidermis test method” (2015).
  - 43) K. Saito *et al.*, *Toxicol. In Vitro*, **27**(8), 2213 (2013).
  - 44) F. Cottrez *et al.*, *Toxicol. In Vitro*, **29**, 787 (2015).





須藤 英典  
*Hidenori SUTO*

住友化学株式会社  
生物環境科学研究所  
主任研究員  
博士（生命科学）



奥田 優  
*Yu OKUDA*

住友化学株式会社  
生物環境科学研究所  
主任研究員  
博士（農学）



檜垣 環  
*Tamaki HIGAKI*

住友化学株式会社  
生物環境科学研究所  
研究員



堀江 宣行  
*Nobuyuki HORIE*

住友化学株式会社  
生物環境科学研究所  
主席研究員



北野 紗季  
*Saki KITANO*

住友化学株式会社  
生物環境科学研究所  
研究員



山口 尊史  
*Takafumi YAMAGUCHI*

住友化学株式会社  
生物環境科学研究所  
主席研究員