

Guideline on Defined Approaches for Skin Sensitisation (DASS、OECD ガイドライン No. 497) による皮膚感作性総合評価

発表者：藤島 沙織 (化学物質安全部門)

1. 背景及び目的

皮膚感作性とは、化学物質の皮膚接触後にアレルギー反応を引き起こす性質であり、従来はモルモットやマウスを用いる試験法により評価されてきた。しかし近年は動物福祉の観点から、動物を用いない皮膚感作性試験代替法による評価が多く実施されている。

化学物質による皮膚感作は、皮膚に接触した化学物質の①タンパク質との共有結合に始まり、②角化細胞の活性化、③樹状細胞の活性化、④T細胞の活性化及び増殖という複数の Key Event (KE1~KE4) からなる有害性発現経路 (Adverse Outcome Pathway、AOP) を経て発現する (図 1 参照)。皮膚感作の KE を引き起こす物質は皮膚感作性を有する可能性があり、各 KE に対応した皮膚感作性試験代替法が開発され、経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development、OECD) でテストガイドライン (TG) 化されている。また、これらの反応を誘発する特有の化学構造 (アラート構造) の有無から化学物質の感作性を予測するソフトウェアも開発されている。

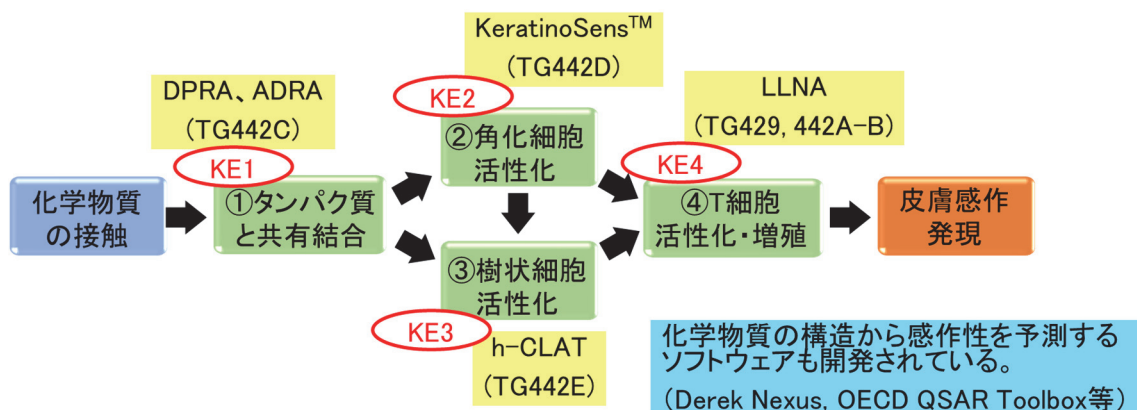


図 1 皮膚感作の AOP*¹ 及び各 KE*² に対応した皮膚感作性試験代替法

*1: Adverse Outcome Pathway (有害性発現経路)、*2: Key Event (キーイベント)

これらの代替法試験を行政活用する戦略として、OECD では AOP の各 KE に対応した試験の組合せや、ばく露を含む周辺情報による評価を試みており、2021 年に組合せ評価のためのガイドライン¹⁾ (Guideline on Defined Approaches for Skin Sensitisation: DASS、OECD ガイドライン No. 497) を発出した。本機構は、DASS に基づく皮膚感作性総合評価の実施体制を整備した。その内容について紹介する。

2. 試験法及び感作性予測ソフトウェア

組合せ評価に用いる KE1~3 に対応する試験法及び感作性予測ソフトウェアの概要を以下に示す。

2.1 KE1: ペプチド結合性試験 (Direct Peptide Reactivity Assay: DPRA、TG442C)

化学物質とタンパク質との共有結合に着目した *in chemico* 試験である。化学物質とシステイン及びリジンをそれぞれ含有する 2 種のモデルペプチドを反応させ、未反応のモデルペプチド量を HPLC で定量し、その平均ペプチド減少率から、皮膚感作性の有無を判定する。

2.2 KE2: 角化細胞株レポーターアッセイ (ARE-Nrf2 Luciferase Test Method: KeratinoSensTM、TG442D)

角化細胞の活性化の指標として、レポーターアッセイによりルシフェラーゼ発現量を測定する *in vitro* 試験である。ルシフェラーゼ活性の誘導倍率から、皮膚感作性の有無を判定する。

2.3 KE3: ヒト細胞株活性化試験 (Human Cell Line Activation Test: h-CLAT、TG442E)

樹状細胞様の反応を示すヒト単球性白血病由来細胞株 THP-1 細胞を用い、化学物質ばく露後の細胞表面抗原の発現量を蛍光強度として測定する *in vitro* 試験である。抗原発現量の増加率から、皮膚感作性の有無を判定する。

2.4 Derek Nexus 及び OECD QSAR Toolbox

コンピューターを用いて構造活性相関 (SAR) により定性的な毒性予測を行う *in silico* 予測法である。評価したい物質の化学構造中に、感作性発現に関わる特徴的な部分構造 (アラート構造) が含まれるか否かを指標に、皮膚感作性の有無を判定する。

3. DASS による組合せ評価

DASS には、上記 KE1~3 の試験や *in silico* 予測法を組合わせて皮膚感作性の有害性 (Hazard) と強度 (Potency) を評価する方法が 3 つ定義されている (表 1 参照)。

表 1 DASS*3 に定義されている皮膚感作性の組合わせ評価法

組合せ評価法	使用する試験法及び予測ソフトウェア	得られる結果
2 out of 3 Defined Approach	DPRA (KE1) 、 KeratinoSens™ (KE2) 、 h-CLAT (KE3)	Hazard
Integrated Testing Strategy (ITSv1)	DPRA (KE1) 、 h-CLAT (KE3) 、 Derek Nexus (<i>in silico</i> 予測法)	Hazard Potency
Integrated Testing Strategy (ITSv2)	DPRA (KE1) 、 h-CLAT (KE3) 、 OECD QSAR Toolbox (<i>in silico</i> 予測法)	Hazard Potency

*3 : Guideline on Defined Approaches for Skin Sensitisation (OECD ガイドライン No. 497)

3.1 2 out of 3 Defined Approach (2 out of 3)

KE1～3 に対応した試験法 (DPRA、KeratinoSens™ 及び h-CLAT) のうち 2 種類の試験法で結果が一致した場合、その結果を支持するという機械的アプローチである。各試験結果について、判定基準に基づいて「陰性」、「境界域」、「陽性」のいずれかに判定し、その結果から図 2 に示すフローに従い皮膚感作性を評価する。

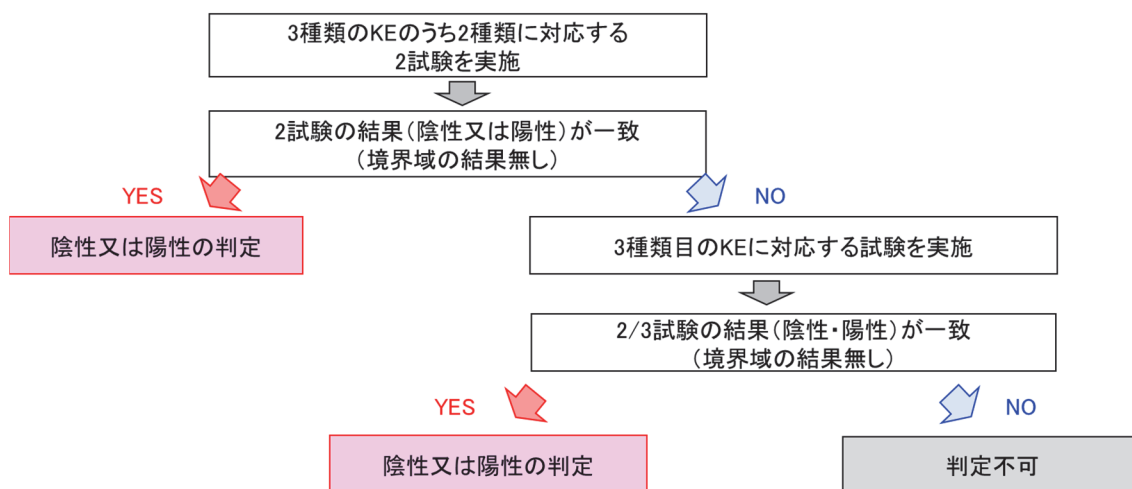


図 2 2 out of 3 Defined Approach の判定フロー

3.2 Integrated Testing Strategy (ITS)

DPRA のペプチド減少率、h-CLAT の陽性判定となる最低濃度 (MIT : The minimum induction threshold) 及び *in silico* 予測法である Derek Nexus 又は OECD QSAR Toolbox を用いた感作性予測結果に対し、表 2 に従いスコアリングを行う。さらに、図 3 に示す

判定フローに従って、各スコアを合計して皮膚感作性を評価する。GHS 細区分 1A 又は 1B に相当する強度評価が可能な場合もある。

表 2 Integrated Testing Strategy における各試験法のスコアリング

DPRA のペプチド減少率 (%)		h-CLAT の MIT ($\mu\text{g/mL}$)	Derek Nexus 又は OECD QSAR Toolbox	スコア
システイン 及びリジン 含有ペプチド	システイン含有 ペプチドのみで 評価可能な場合			
≥ 42.47	≥ 98.24	≤ 10	-	3
≥ 22.62 、 < 42.47	≥ 23.09 、 $< 98.24\%$	> 10 、 ≤ 150	-	2
≥ 6.38 、 < 22.62	≥ 13.89 、 < 23.09	> 150 、 ≤ 5000	陽性	1
< 6.38	< 3.89	陰性	陰性	0

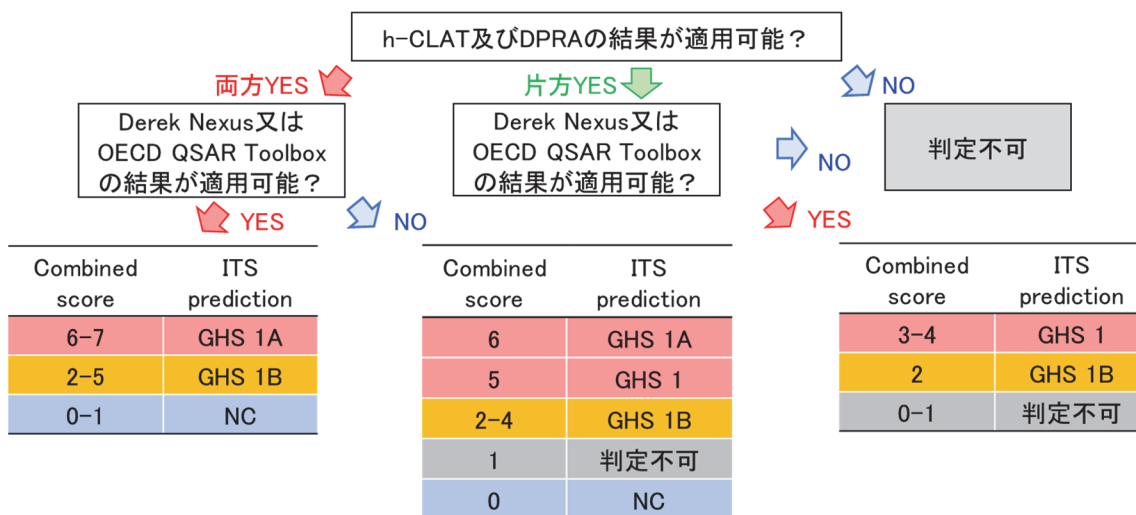


図 3 Integrated Testing Strategy の判定フロー

4. まとめ

本機構では、DASS による総合評価を含めた皮膚感作性に関するすべての KE 関連試験 (今回は紹介していない LLNA 及び ADRA 等の試験も含む) 及び *in silico* 予測法を実施可能な体制を整えている。また、皮膚感作性評価における試験設計及び結果の解釈に至るまでのコンサルテーションを含めた対応が可能である。

5. 参考文献

- 1) OECD Guideline No. 497 “Guideline on Defined Approaches for Skin Sensitisation” (DASS)