

CERIの皮膚感作性試験

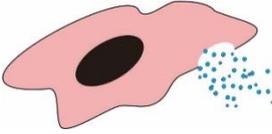
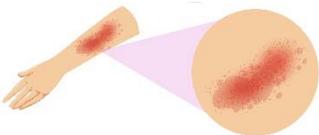
- ◆ *in vivo* 試験
- ◆ *in vitro* 試験
- ◆ *in chemico* 試験
- ◆ *in silico* 予測
- ◆ Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA)

受託サービス一覧

試験項目	OECD TG No.	GLP 対応	ページ
Local Lymph Node Assay (LLNA-RI法)	429	-	3
Local Lymph Node Assay (LLNA: BrdU-ELISA法)	442B	○	5
Human Cell Line Activation Test (h-CLAT)	442E	○	7
Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)	442C	○	8
ARE-Nrf2 Luciferase Test Method (KeratinoSens™)	442D	-	9
Derek Nexus を用いた皮膚感作性予測	- ((Q)SAR)	-	9
Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA)	-	-	10

化学物質とアレルギーに関して ～ご存じですか？～

化学物質は皮膚と接触することにより接触性皮膚炎をおこすことがあります。このような性質を皮膚感作性といいます。極微量でも接触性皮膚炎をおこすことがあります。労働者だけでなく一般消費者まで幅広く問題となっています。そのため、近年では皮膚感作性を評価する手法の開発が盛んです。下表に化学物質による皮膚アレルギーのAdverse Outcome Pathway (AOP) の各Key eventとそれに対応した皮膚感作性試験をまとめました。

AOP key event		対応するツール
物質の構造・物理化学的性質 	<ul style="list-style-type: none"> ・透過性 (LogPに基づく) ・求電子性の物質等 	QSAR Derek Nexus
分子的な応答 	細胞中タンパク質との共有結合	DPRA (TG442C)
細胞応答 	<ul style="list-style-type: none"> ・ケラチノサイトの活性化 ・細胞保護遺伝子パスウェイの発現 ・炎症性サイトカイン及び表面分子の発現 ・樹状細胞の遊走 	ARE-Nrf2 Luciferase Test Method (TG442D) h-CLAT (TG442E)
リンパ節応答 	<ul style="list-style-type: none"> ・樹状細胞による抗原提示 ・T細胞の活性化 ・T細胞の拡散 	LLNA-RI法 (TG429) LLNA : BrdU-ELISA法 (TG442B)
個体応答 	炎症反応	GPMT/BT (TG406)

LLNA-RI法

RI標識を使用する皮膚感作性試験

■ LLNA (局所リンパ節増殖試験: Local Lymph Node Assay) について

- ・皮膚感作性試験とは、化学物質が皮膚に接した場合に皮膚アレルギーを誘発するリスクを評価する試験です。
- ・OECDのテストガイドライン(TG429)として採択されています。
- ・EPAのガイドラインではLLNAが皮膚感作性試験法の選択肢として明記され、国内では2012年に厚生労働省から公表されたガイダンス¹⁾で化粧品・医薬部外品の皮膚感作性評価においてLLNAが推奨されるなど、各国の規制当局で推奨されています。
- ・CERIではLLNAに関し、約20年にわたる豊富な経験と実績を有しており、独自に開発したRIを使用しないLLNA(LLNA:BrdU-ELISA)もTG442BとしてOECDガイドラインに記載されています。

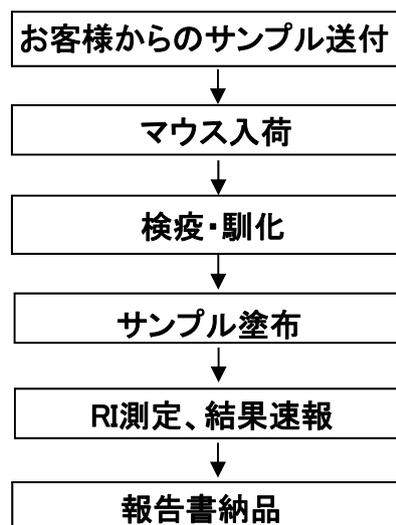
1) 「皮膚感作性試験代替法及び光毒性試験代替法を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンスについて」

■ LLNA-RI法の特徴

- ◆ EC3値²⁾での感作性の定量的評価が可能！
- ◆ 抗原認識過程を検出するため、炎症を惹起せず動物に苦痛を与えない！
- ◆ 有色化学物質でも、色の影響を受けない！
- ◆ モルモットを用いる方法に比べて短期間、安価！
- ◆ 使用動物数が少ない！

2) EC3値: 媒体対照を1とした場合の相対応答倍率 (Stimulation index) が3になる濃度

■ ご依頼から試験までの流れ



標準納期: マウス入荷から3週間で速報送付、その翌週に報告書納品

使用マウス: CBA/J、CBA/Ca

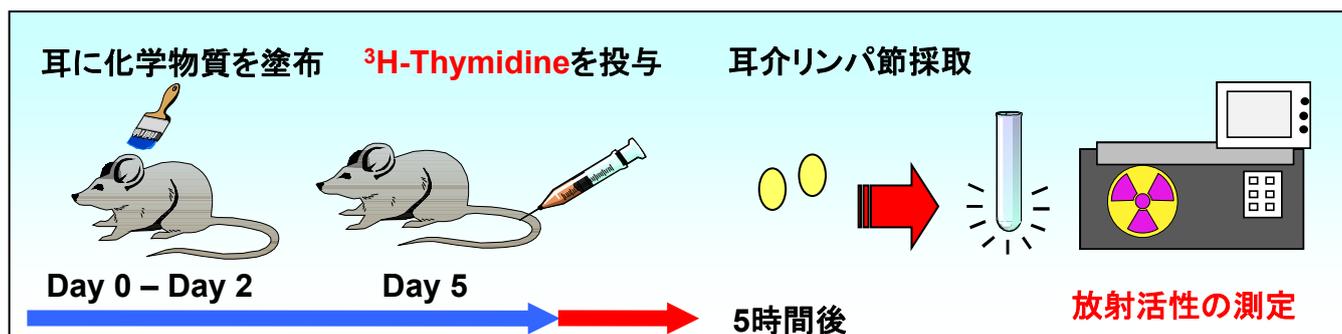


図1 LLNA-RI 実験フロー

このような時にもご使用いただけます！！

- **GHS区分による自主管理**
GHSではEC3を指標に区分1A、区分1Bに分類することができます！
- **スクリーニング**
1物質1用量からの試験も承っています。
感作性強度既知の物質と同時に試験することにより、多検体の感作性強度を推定することができます。

豊富な試験実績！！

CERIでは、LLNA-RI法及びLLNA:BrdU-ELISA法をこれまでに**1000検体以上**を試験・評価した受託実績があります。

毎年多くのお客様からご愛顧をいただいております。高い技術力と豊富な実績により、お客様にご満足いただける高い信頼性を確保しています。

1回で多検体処理が可能！！

- 1試験で**最大5検体**まで同時に試験可能です³⁾。

1回に多数の検体をご依頼していただくと、1検体当たりの費用がお安くなります！
年間の包括契約を結びますと更にお安くなります！！

3) 1検体3用量群(1群4匹)で試験した場合

お見積りのお問合せはお気軽にどうぞ。

LLNA : BrdU-ELISA法

RI標識を使用しない皮膚感作性試験

☑ CERIで開発

■ LLNA : BrdU-ELISA法について

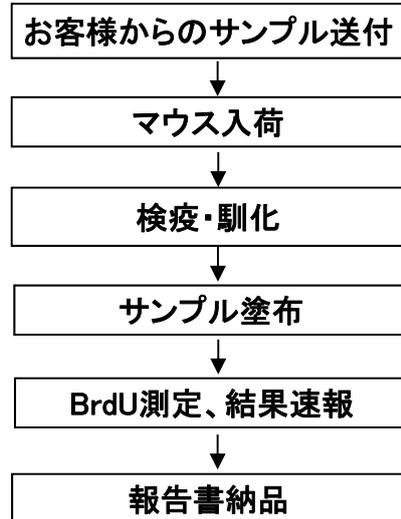
- ・皮膚感作性試験とは、化学物質が皮膚に接した場合に皮膚アレルギーを誘発するリスクを評価する試験です。
- ・OECDのテストガイドライン(TG442B)として採択されています。
- ・国内では2013年に厚生労働省から公表されたガイダンス¹⁾で化粧品・医薬部外品の皮膚感作性評価において推奨されています。
- ・CERIではLLNA に関し、約20年にわたる豊富な経験と実績を有しています。

1) 「皮膚感作性試験代替法としてのLLNA :BrdU-ELISA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」

■ LLNA : BrdU-ELISA法の特徴

- ◆ EC1.6値での感作性の定量的評価が可能！
- ◆ 抗原認識過程を検出するため、炎症を惹起せず動物に苦痛を与えない！
- ◆ 有色化学物質でも、色の影響を受けない！
- ◆ モルモットを用いる方法に比べて短期間、安価！
- ◆ 使用動物数が少ない！
- ◆ 放射性物質(RI)を使用しない！

■ ご依頼から試験までの流れ



標準納期: マウス入荷から3週間で速報送付、その翌々週に報告書納品

使用マウス: CBA/J

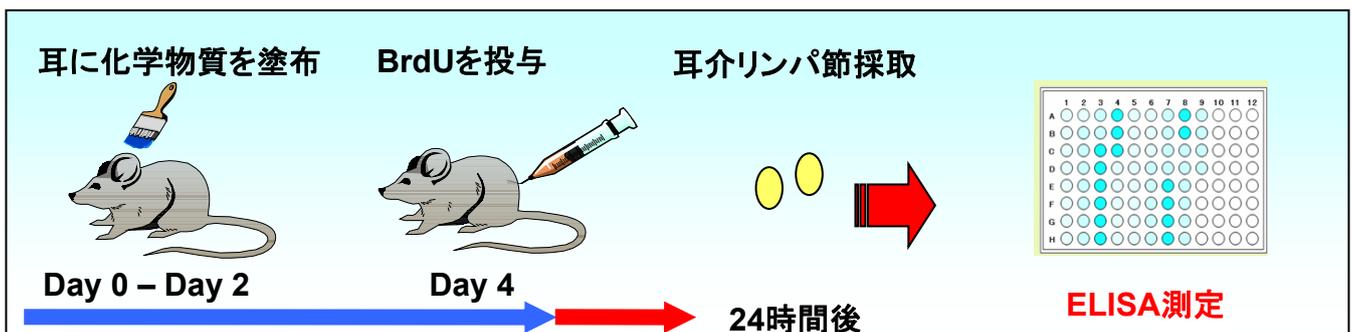
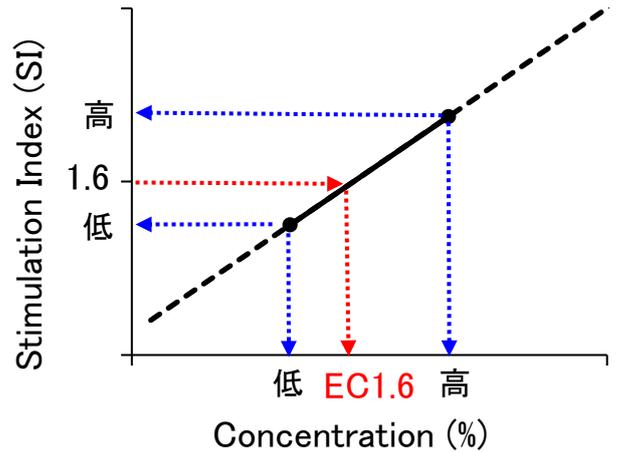


図2 LLNA : BrdU-ELISA法 実験フロー

判定基準とEC値(感作性強度の指標)

判定基準	
Stimulation Index (SI)	判定
$2.0 \leq SI$	陽性
$1.6 \leq SI < 2.0$	原則陽性 (用量相関等を考慮)
$SI < 1.6$	陰性



LLNA-RI法と同等の感度！

Chemical	EC3(%) of LLNA-RI	0.5x - 2.0x EC3	EC1.6(%) of LLNA: BrdU-ELISA
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	0.009	0.0045-0.018	0.010
DNCB	0.049	0.025-0.099	0.029
1,4-Phenylenediamine	0.11	0.055-0.22	0.22
Cobalt chloride	0.6	0.3-1.2	0.34*
Isoeugenol	1.5	0.77-3.1	1.3
2-Mercaptobenzothiazole	1.7	0.85-3.4	20
Citral	9.2	4.6-18.3	11.7
HCA	9.7	4.8-19.5	7.07
Eugenol	10.1	5.05-20.2	6.03
Phenyl benzoate	13.6	6.8-27.2	36.7
Cinnamic alcohol	21	10.5-42	10
Imidazolidinyl urea	24	12-48	6.43
Methyl methacrylate	90	45-100	75
Sodium lauryl sulfate	8.1	4.05-16.2	1.53*
Ethylene glycol dimethacrylate	28	14-56	28.2
Xylene	95.8	47.9-100	43.3

*: EC1.6ex値: 全試験群でSI>1.6となった時の推定値

宮浦ら.(2010). LLNA: BrdU-ELISA法の検出精度評価. 第23回日本動物実験代替法学会大会

小林ら.(2012). CBA/JマウスのLocal Lymph Node Assay:BrdU-ELISA法への適用性. 第19回日本免疫毒性学会

近藤ら.(2018). LLNA:BrdU-ELISA(OECD TG442B)を用いたGHS細区分のための判定基準の提案. 日本動物実験代替法学会第31回大会

LLNA-RI法との感作性判定一致率は97.8%!!

関連論文

- Kobayashi, T. et al. Applicability of the proposed GHS subcategorization criterion for LLNA:BrdU-ELISA (OECD TG442B) to the CBA/J strain mouse. J Appl Toxicol. 2020. doi: 10.1002/jat.3996
- Maeda, Y., Takeyoshi, M. Proposal of GHS sub-categorization criteria for LLNA: BrdU-ELISA (OECD TG442B). Reg Toxicol Pharmacol. 2019; 107:104409.
- Kojima H, et al. Inter-laboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation. J Appl Toxicol. 2011;31(1):63-74.

h-CLAT (human Cell Line Activation Test)

(*in vitro* 皮膚感作性試験)

■ h-CLATとは

- ・h-CLATは、ヒト単球性白血病患者由来細胞株 (THP-1細胞) を用い、化学物質ばく露後の細胞表面抗原 (CD86、CD54) の発現量の変化を指標として皮膚感作性を評価する *in vitro* 試験法です。
- ・動物を使わずに皮膚感作性を予測できる試験として、2016年にOECD TG442Eとして採択されています。
- ・他の *in silico* 予測法や *in chemico* 試験と組み合わせ、Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) に利用可能です。

■ h-CLAT試験方法

【方法】

- 1 化学物質を細胞にばく露
- 2 24時間培養後、細胞表面のCD86及びCD54を抗体染色
- 3 フローサイトメーターで分析
- 4 CD86及びCD54の発現量の変化を、媒体対照を100%とした相対蛍光強度 (RFI) として算出

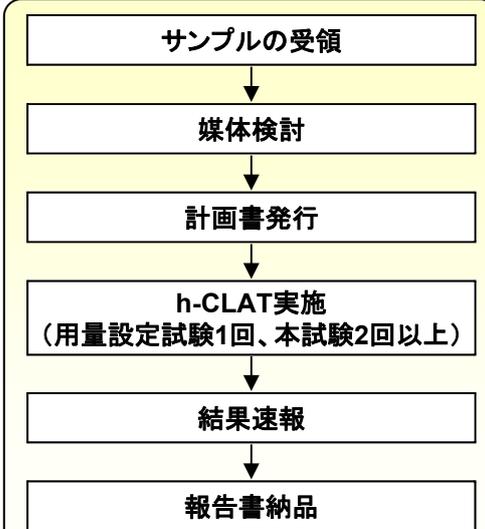


フローサイトメーター
Navios EX
(Beckman Coulter社)

【評価】

陽性判定基準: CD86: RFI > 150%, CD54: RFI > 200%
最大3回実施し、2回以上陽性の場合に皮膚感作性陽性と判定

■ ご依頼から試験までの流れ



■ TG442Eの技術確認用10物質の試験結果

技術確認用物質	CV75 (μg/mL)		CD86				CD54			
	TG 442E	CERI	TG 442E		CERI		TG 442E		CERI	
			EC150 (μg/mL)	判定	EC150 (μg/mL)	判定	EC200 (μg/mL)	判定	EC200 (μg/mL)	判定
2,4-Dinitrochlorobenzene	2-12	3	0.5-10	P	1.7	P	0.5-15	P	2.2	P
1,4-Phenylenediamine	5-95	32	<40	P	10.6	P	>1.5	N	>38.6	N
Nickel sulfate	30-500	168	<100	P	25.8	P	10-100	P	24.8	P
2-Mercaptobenzothiazole	30-400	37	>10	N	>63	N	10-140	P	43.8	P
R(+)-Limonene	>20	364	>5	N	>437	N	<250	P	108.9	P
Imidazolidinyl urea	25-100	44	20-90	P	50.0	P	20-75	P	44.8	P
Isopropanol	>5000	>5000	>5000	N	>5000	N	>5000	N	>5000	N
Glycerol	>5000	>5000	>5000	N	>5000	N	>5000	N	>5000	N
Lactic acid	1500-5000	3124	>5000	N	>3744	N	>5000	N	>3744	N
4-Aminobenzoic acid	>1000	>1000	>1000	N	>1000	N	>1000	N	>1000	N

P: 陽性、N: 陰性、CV75: 細胞生存率 (Cell Viability) が75%となる濃度

EC150: CD86発現量においてRFI=150%になる濃度、EC200: CD54発現量においてRFI=200%になる濃度

OECD TG442Eに記載の判定と全て一致し、CV75、EC150及びEC200に関してもクライテリアの範囲内になることを確認！

- ・ご要望に応じたGLP試験、簡易試験、スクリーニング試験も実施可能！
- ・*in chemico*試験、*in silico*評価法との組み合わせにより、より信頼性の高い評価が可能！

DPPRA (Direct Peptide Reactivity Assay)

(*in chemico* 皮膚感作性試験)

■ DPPRAとは

- DPPRAは、感作成立の初期反応である**化学物質とタンパク質の結合**に着目した皮膚感作性試験です。
- 被験物質とモデルペプチドを反応させ、反応液中の**ペプチドの減少率**をHPLCを用いて測定し、皮膚感作性を予測します。
- **動物を使わずに皮膚感作性を予測できる試験**として、2015年にOECD TG442Cとして採択されています。
- マウスを用いる局所リンパ節増殖試験(LLNA)やモルモットマキシマイゼーション法(GPMT)に比べ、**短期間で安価に実施**できます。

■ DPPRA試験例

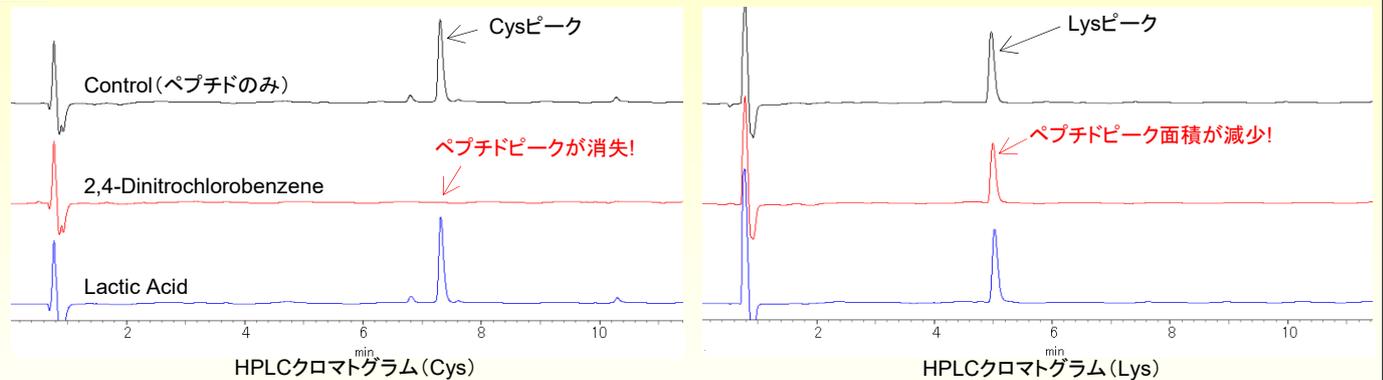
被験物質

2,4-Dinitrochlorobenzene (皮膚感作性陽性)、Lactic Acid (皮膚感作性陰性)

方法

被験物質とシステインペプチド(Cys)及びリジンペプチド(Lys)を混合し、25°Cで24時間反応 → HPLCにより分析

分析結果



評価法

ペプチド減少率 = $(1 - \frac{\text{被験物質と反応させたペプチドのピーク面積}}{\text{コントロールのペプチドのピーク面積}}) \times 100$

Cys及びLys減少率の平均値を用いて評価

評価結果

被験物質	ペプチド減少率(%)			感作性予測
	Cys	Lys	平均値	
2,4-Dinitrochlorobenzene	100	17.6	58.8	陽性
Lactic Acid	0	0	0	陰性

■ ご依頼から試験までの流れ



■ TG442Cの技術確認用10物質の試験結果

技術確認用物質	ペプチド減少率(%)			
	Cys		Lys	
	CERI	TG442C	CERI	TG442C
2,4-Dinitrochlorobenzene	100	90-100	17.6	15-45
Oxazolone	66.0	60-80	54.2	10-55
Formaldehyde	57.8	30-60	1.4	0-24
Benzylideneacetone	92.4	80-100	0.0	0-7
Farnesal	15.7	15-55	4.5	0-25
2,3-Butanedione	66.4	60-100	18.8	10-45
1-Butanol	0.6	0-7	0.8	0-5.5
6-Methylcoumarin	1.4	0-7	0.0	0-5.5
Lactic Acid	1.0	0-7	0.0	0-5.5
4-Methoxyacetophenone	1.0	0-7	0.0	0-5.5

- 実験開始後、2週間以内に速報として試験結果をご連絡！
- 2015年に受注を開始し、100物質を超える豊富な実績！
- 各種*in vitro*試験、*in silico*評価法との組合せにより、より信頼性の高い評価が可能！
- コントロールと共溶出する物質も評価できるメソッドを構築！

KeratiNoSens™ (ARE-Nrf2 Luciferase Test Method) (*in vitro* 皮膚感作性試験)

■ KeratiNoSens™とは

- ・KeratiNoSens™は、感作性発現機序におけるNrf2-Keap1-ARE pathwayによる遺伝子発現誘導の活性化に着目した皮膚感作性試験です。
- ・角化細胞に化学物質をばく露し、レポーターアッセイによるルシフェラーゼ発現量を測定することで皮膚感作性を評価する*in vitro*試験法です。
- ・動物を使わずに皮膚感作性を予測できる試験として、2015年にOECD TG442Dとして採択されています。
- ・Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) 等に利用可能です。

■ KeratiNoSens™試験方法

【方法】

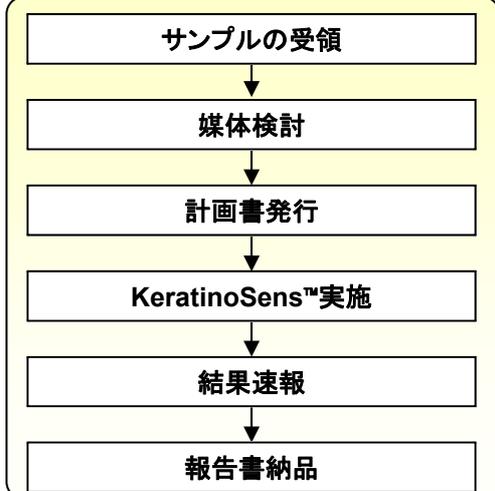
- 1 化学物質を細胞にばく露(48時間)
- 2 ルシフェラーゼ基質添加後、発光測定及びMTTアッセイ後、吸光度測定
- 3 媒体対照を100%としたルシフェラーゼ活性の誘導倍率 (fold induction)、最大誘導倍率 (I_{max}) 及び細胞生存率を算出

【評価】

陽性判定基準:

- 1 $I_{max} \geq 1.5$ かつ統計学的有意差あり
 - 2 fold induction ≥ 1.5 となる最低濃度 (EC1.5) での細胞生存率が70%超
 - 3 $EC1.5 < 1000 \mu M$
 - 4 用量反応性あり
- 最大3回実施し、2回以上陽性の場合に皮膚感作性陽性と判定

■ ご依頼から試験までの流れ



- ・ご要望に応じた簡易試験、スクリーニング試験も実施可能!
- ・*in chemico*試験、*in vitro*試験及び*in silico*予測法との組合せにより、より信頼性の高い評価が可能!

Derek Nexusによる皮膚感作性予測 (*in silico* 皮膚感作性試験)

Derek Nexus は化合物の構造からその毒性を予測する知識ベース (Knowledge Base) のエキスパートシステムです。

* Derek NexusはLhasa社の登録商標です。



CERI では構造が確定している物質に関して、皮膚感作性のアラート構造の有無及び予測の根拠 (参考文献情報を含む) 等のDerek Nexus の予測結果を提供します。

- ・ver 5.0.1からLLNA EC3の予測値算出機能が追加されました。
- ・ver 6.0.1から皮膚感作性に対するNegative Prediction機能が追加されました。

このような時におススメ!!

- ・潜在的な皮膚感作性の可能性についてスクリーニングしたい!
- ・*in vitro*試験法と組み合わせて、皮膚感作性の評価をしたい!

Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA)

Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA)とは？

IATAとは複数の試験法を組み合わせて総合的に評価する手法をいいます。
これまでにDPRAやh-CLATなどの *in vitro* 試験法やDerek Nexusのような *in silico* による予測を組み合わせて皮膚感作性を評価する方法がOECDで検討されています。

CERIの特色

- LLNA等の *in vivo* 皮膚感作性試験の実績が豊富
- 機器分析、細胞実験の実績が豊富
- Derek Nexus の国内唯一のサービスプロバイダー



これらの実績に加え、皮膚感作性試験、リスク評価のエキスパートたちが結論を得るまで確実に支援！！

実施例

Derek Nexus、DPRA、h-CLATをそれぞれ皮膚感作性既知の6物質に対して試験し、評価基準に従いスコア化し、総合スコアで評価。

表1 評価基準*

Score	h-CLAT MIT ($\mu\text{g/ml}$)	DPRA Depletion (%)	Derek Nexus Alert
0	なし	<6.38	なし
1	150-5000	6.38-22.62	あり
2	10-150	22.62-42.47	
3	<10	>42.47	

総合スコア: 0-1 (Not Classified: NC)、2-6 (Weak)、7 (Strong)

表2 IATA結果

物質名	Score				Class	Reference *	
	Derek Nexus	DPRA	h-CLAT	Total		Score	Class
2,4-Dinitrochlorobenzene	1	3	3	7	Strong	7	Strong
Formaldehyde	1	2	3	6	Weak	6	Weak
Cinnamic Aldehyde	1	3	2	6	Weak	6	Weak
1-Butanol	0	0	0	0	NC	0	NC
Lactic acid	0	0	0	0	NC	0	NC
Glycerol	0	0	0	0	NC	0	NC

* 竹之内ら (2012) 粧工連における代替法を用いた皮膚感作性評価への取り組み (第1報) - *in vitro* 試験 / *in silico* system を組み合わせた評価体系の構築 - 第25回日本動物実験代替法学会大会

報告例の判定結果と一致することを確認！！

- ✓ 評価の一例としてDerek Nexus、DPRA、h-CLATの組合せ例をお示しましたが、この他にも試験系設計から承ります。
- ✓ **Defined Approaches for Skin Sensitisation (DASS)** についてもご相談ください。

CERIの皮膚感作性試験の特徴

- ・感作性に関する基礎研究、試験法開発や実験経験を通して豊富な知識・高度な技術を保有しています。
- ・感作性評価における試験設計、結果の解釈に至るまでコンサルテーションを含めた対応が可能です。



その他の安全性試験や新規試験法の開発も受託しています。
お気軽にお問い合わせください。



[化学物質安全センター] LLNA: BrdU-ELISA法、h-CLAT、DPRA、IATA

(東日本担当窓口)

化学物質安全センター営業企画部

〒112-0004 東京都文京区後楽1-4-25 日教販ビル7F

Tel: 03-5804-6134 / FAX: 03-5804-6140

E-mail(東日本、西日本共通): cbc@ceri.jp

(西日本担当窓口)

化学物質安全センター大阪支所

〒577-0011 大阪府東大阪市荒本北1-5-55

Tel: 06-6744-2045 / FAX: 06-6744-2052

[安全性評価技術研究所] LLNA-RI法、試験法開発

〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600番地

E-mail: cac-bio@ceri.jp

TEL: 0480-37-2601

FAX: 0480-37-2521

[安全性評価技術研究所] *in silico*による予測、皮膚感作性リスク評価、IATA

〒112-0004 東京都文京区後楽1-4-25 日教販ビル7F

E-mail: cac-reach@ceri.jp

TEL: 03-5804-6136

FAX: 03-5804-6149