

## 化粧品原料の皮膚感作性に対する動物を用いない評価技術の適用と実践

西條 拓

皮膚感作性物質に触れることによって引き起こされるアレルギー性接触皮膚炎は、しばしば労働者や消費者の QOL の低下を引き起こす。そのため感作性は、化粧品や医薬品に配合する物質の安全性評価において重要な評価項目である。近年、倫理上・法規制上の観点から動物を用いない評価が求められており、動物実験代替法として、感作過程の初期の3つのキーイベントである、①タンパク結合性、②角化細胞活性化、③樹状細胞活性化、に着目した *in vitro* 試験法、すなわち、①direct peptide reactivity assay、②KeratinoSens™、③human cell line activation test (h-CLAT) が開発されてきた<sup>1-4)</sup>。しかし、これら *in vitro* 試験単独ではキーイベントの1つしか反映できず、また感作の予測性が不十分であるため、複数の *in vitro* 試験に加え物理化学的性状や *in silico* データを組み合わせる手法が、盛んに行われてきた<sup>5)</sup>。

感作リスクは、ハザードと暴露量の観点に基づいてアセスメントすることができる。実際の化粧品原料を評価するにあたっては、感作性の有無の精緻な予測に加えて、感作強度の予測が必要となる。しかし、動物を用いない感作強度の予測に基づくリスクアセスメント法はいまだ明確化されておらず、実際の化粧品の評価において課題となっている。一方、化粧品においては、水、ethanol や 1,3-butylene glycol などの溶媒を用いて抽出した植物エキスも多く、抽出した植物エキス中には感作性を有する物質も存在して接触皮膚炎を引き起こす恐れがある<sup>6)</sup>。感作性発現には様々な反応機構があり、感作性を誘導する化学構造も多岐に渡るため、植物エキス中の感作性物質を網羅的に定性・定量することは困難である。そこで、化学分析以外の方法として動物を用いない評価法によるリスクアセスメントが望まれている。しかしながら、動物を用いない試験法において、混合物中の感作性物質に対する検出力は明確になっておらず、動物を用いない評価戦略も構築されていない。そこで本研究では、化学構造既知の原料の評価に向けて高純度単一物質の感作性の有無および強度の予測に基づくリスクアセスメント戦略の構築と、複雑な混合物である植物エキス中の感作性物質に対する動物を用いない評価技術の適用性検証とリスクアセスメント戦略を検討することで、さまざまな化粧品原料を評価できることを目指した。

第1編では、高純度単一物質の感作ハザードの有無および強度の予測に基づくリスクアセスメント戦略の構築を行った。まず、第1章において *in vitro* 試験の組み合わせによる高感度なハザード検出を検討し、その結果、KeratinoSens™と h-CLAT の組み合わせは感作性のハザード予測において、被験物質が非感作性物質であることを明確化する手法として有用であることを見出した。さらに2章では、Bayesian Network Integrated Testing Strategy (BN ITS-3)<sup>7)</sup> による感作強度予測に基づくリスクアセスメントの実現を目的に検討を行った。BN ITS-3 の予測性限界となりうる物質 (アシル転移誘導物質、アミン反応性物質、難水溶性物質、pre-/pro-hapten) を除外すれば、strong、moderate、weak および非感作性物質として分類される4段階の予測性は、それぞれ 92.3% (12/13)、53.3% (16/30)、56.6% (14/25) および 96.2% (25/26) と高い相関性を示した。20.6% (14/68) の感作性物質については過小評価となったが、過小評価するとしても1分類の違いの範囲であった。そこ

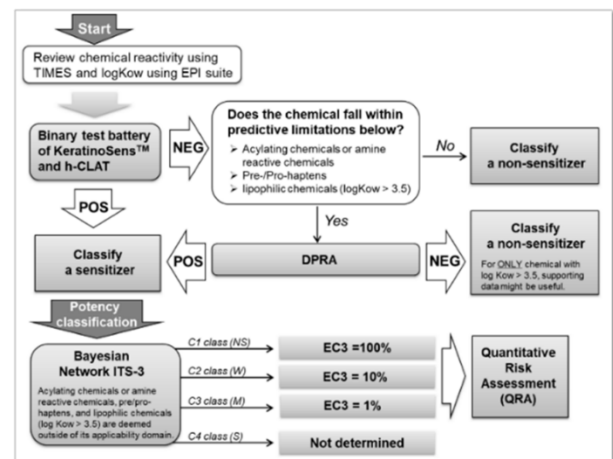


Figure 1 KeratinoSens™と h-CLAT の組み合わせと BN ITS-3 に基づくリスクアセスメントフロー

で、BN ITS-3 による過小評価の可能性を最小化するために、新たな感作強度分類を定義した。以上をふまえ、第1編では、KeratinoSens™と h-CLAT の組み合わせと BN ITS-3 に基づくリスクアセスメント戦略をふまえ、評価フローを構築した (Figure 1)。

第2編では、植物エキス中の感作性物質に対する動物を用いない評価技術の適用性検証とリスクアセスメント戦略の構築を行った。第1章では、評価技術の適用性を検証すべく、微量の感作性物質を検出する際の

検出感度 (検出濃度) について動物実験である local lymph node assay (LLNA) と代替法の比較を行った。ここで、代替法には混合物の評価が技術的に適用可能な KeratinoSens™と h-CLAT の組み合わせを用いた。代替法および LLNA のデータが存在する感作性物質 146 品を解析対象とし、LLNA と代替法での検出濃度を比較した。その結果、86% (124/146) の感作性物質について、LLNA に比べ代替法の方が低濃度で検出できることが明らかとなり、植物エキスを LLNA と同等以上の検出下限で評価できる可能性が示された。一方で、14% (22/146) の感作性物質については、LLNA と比べて代替法の検出下限の方が高くなり、仮に植物エキス中にこれらの感作性物質が含まれた場合、代替法によって偽陰性判定してしまう可能性も示唆された。そこで2章では、代替法によるハザード評価に加えて、感作閾値 (dermal sensitization threshold; DST) の概念をふまえた感作リスクアセスメント戦略を検討した。ここで本研究は、次の2つのポイントに着目した。1点目は、感作性試験で陰性の植物エキスに含まれる感作性物質について、最大含有濃度が予想できる点であった。2点目は、感作性の誘導には閾値 (no expected sensitization induction level (NESIL)) が存在する点であった。この2点を考慮し、代替法で陰性となった植物エキスの NESIL (botanical NESIL) を算出した。その上で、評価した植物エキス中にデータセット中の感作性物質が含有していたという仮定のもとで botanical NESIL の 95th percentile 値を算出することで、代替法で陰性となった植物エキスの DST (botanical DST) として 6010  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  を提案し、評価フローを構築した (Figure 2)。

以上より、高純度単一物質の感作ハザードの有無および強度の予測に *in vitro* 試験法および BN ITS-3 を用いたリスクアセスメント戦略を構築し、植物エキス中の感作性物質に対する *in vitro* 試験法の適用性検証を行うことで、さまざまな香粧品原料を網羅的に評価することを可能にした。本成果は、香粧品原料の動物を用いない評価の精緻化と実運用に大きく寄与するものと考えられた。

【引用文献】 1. OECD. (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168; 2. OECD. (2015). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA); 3. OECD. (2015). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 442D: In vitro Skin Sensitization: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method.; 4. OECD. (2016). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 442E: In vitro Skin Sensitization: human Cell Line Activation Test (h-CLAT); 5. OECD. (2016). 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. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development; 6. Kiken, DA, Cohen, DE (2002). Am J Contact Dermat., 13, 148; 7. Jaworska, JS et al. (2015). Arch. Toxicol., 89, 2355

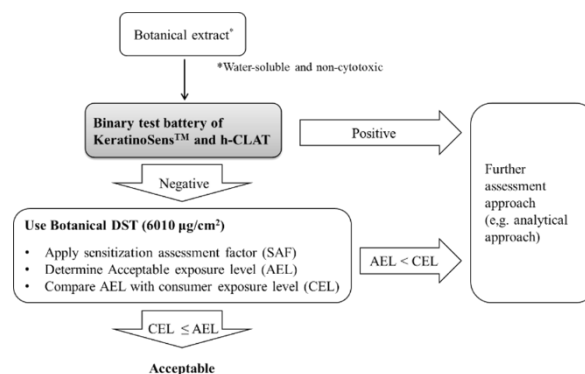


Figure 2 植物エキスの感作リスクアセスメントフロー

## Application and practice of non-animal tests to skin sensitization evaluation of cosmetic ingredients

Taku Nishijo

Allergic contact dermatitis (ACD) resulting from the skin sensitization development frequently worsens the QOL of workers and consumers. Thus, skin sensitization is a key endpoint of safety assessment of the cosmetics and medicine ingredients. The development of non-animal tests has been pursued due to regulatory requirements and ethical issues, and *in vitro* tests have been developed by focusing on the first three key events (KEs) of the adverse outcome pathway (AOP) for the induction phase: the direct peptide reactivity assay addressing KE1 (protein binding), the KeratinoSens™ addressing KE2 (keratinocyte activation) and the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) addressing KE3 (dendritic cell activation)<sup>1-4</sup>. However, because single test is insufficient to cover the whole AOP and have high accuracy, the integrated strategies using multiple tests with physicochemical properties and *in silico* data have been actively developed<sup>5</sup>.

The risk of sensitization can be determined based on the hazard and the exposure level, thus, the prediction of sensitizing potency is required. However, the practical risk assessment (RA) strategy based on the hazard/potency prediction has not been defined yet. On the other hand, in the cosmetic industry, botanical extracts which are frequently extracted and solubilized into vehicles (water, ethanol, and 1,3-butylene glycol), and some containing constituents that may contribute to ACD<sup>6</sup>. In addition, because sensitizers have various mechanistic applicability domains and reaction mechanics, non-target screening analyses of constituents are often difficult. Thus, the author focused on using *in vitro* tests. However, the sensitivity of *in vitro* tests for detecting minute amounts of sensitizers in mixture has not been clarified, and a strategy using *in vitro* tests has not been proposed. Here, to address this issue, the author tried to develop the RA strategy for the ingredient with known chemical structure based on the hazard/potency prediction of high-purified/single chemicals, and for the botanical extract based on the applicability of *in vitro* tests.

In part 1, this study aimed to develop of the RA strategy for high-purified/single chemicals. In chapter 1, the binary test battery (BTB) of KeratinoSens™ and h-CLAT was developed for the identification of non-sensitizer. Furthermore, in chapter 2, the RA strategy using Bayesian Network Integrated Testing Strategy (BN ITS-3)<sup>7</sup> was developed. By excluding potentially under-predictive chemicals (acylating, amine-reactive, lipophilic chemicals and pre/pro-haptens), the predictivity for each four potency classes of strong, moderate, weak sensitizers or non-sensitizers was showed high accuracy of 92.3% (12/13), 53.3% (16/30), 6.6% (14/25), or 96.2% (25/26), respectively. And the mis-prediction (20.6% (14/68)) fell within one potency class. To minimize uncertainty from the under-predictions, the newly defined potency classes considering was assigned.

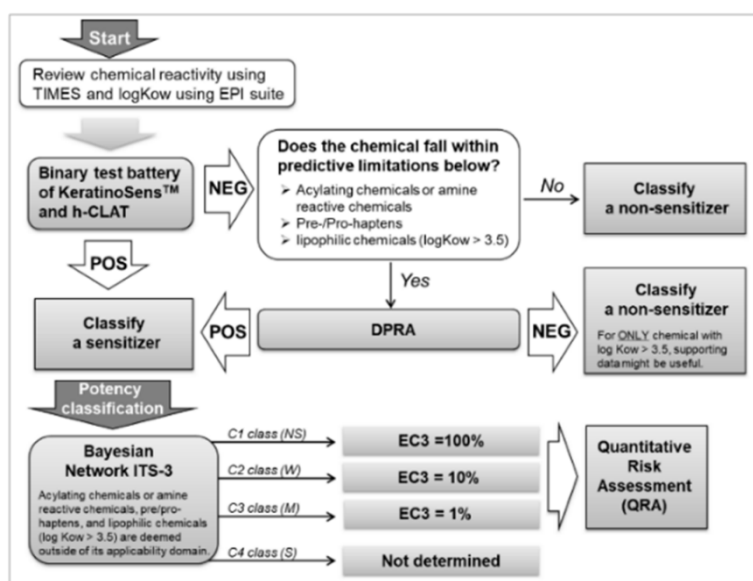


Fig. 1 Risk assessment flow based on the BTB and BN ITS-3

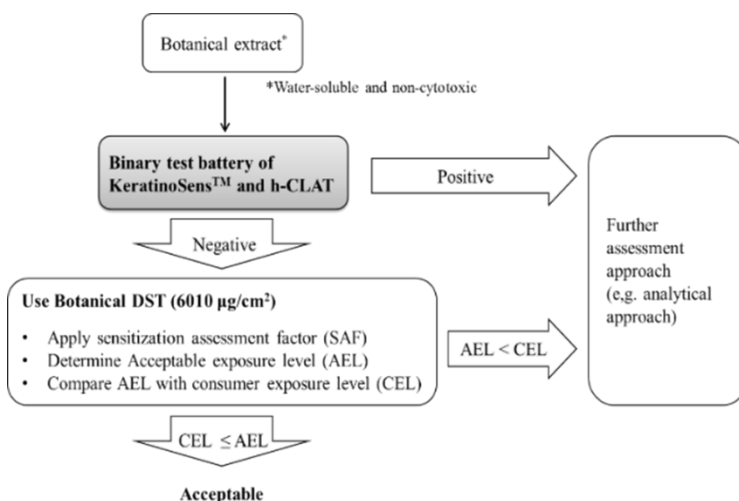
Taken together, the workflow sensitizing potential/potency classification was developed (Fig. 1).

Next, in part 2, the RA strategy for the botanical extract was aimed to be developed. In chapter 1, to clarify the applicability of the *in vitro* tests for the mixtures, the detection sensitivity of minute amounts of sensitizer was assessed by comparing the detection limit (DL) in the animal test of local lymph node assay (LLNA) and *in vitro* tests. The BTB was used due to technical applicability to the testing of

mixtures. The DLs were compared between the LLNA and the BTB for 146 sensitizers with both data. As a result, for 86% (124/146) of sensitizers, the BTB showed the DLs lower than LLNA, suggesting that the BTB has great sensitivity for detection of minute amounts of sensitizer. However, 14% (22/146) of these had higher DLs in the BTB than in LLNA. Thus, in chapter 2, the RA strategy was developed. focusing on following two points; 1. the concentration of the sensitizer in the botanical extract was negative in the BTB could be predicted as <DL despite the likely presence of sensitizers, 2. there exist thresholds (no expected sensitization induction level; NESIL) for the induction of sensitization. Considering these points, NESILs of botanical extracts evaluated as negative in the BTB (botanical NESIL) were derived. A dermal sensitization threshold (DST) value of 6010  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  was derived for botanical extract that was negative in the BTB (botanical DST) by taking the 95th percentile of botanical NESILs, and a workflow is proposed in Fig. 2.

In summary, the RA strategy for the ingredient with known chemical structure was developed based on the hazard/potency prediction using the BTB and BN ITS-3. In addition, the botanical DST approach was developed for the botanical extract. This study will contribute to the application and practice of non-animal tests to sensitization evaluation of various cosmetic ingredients.

**[References]** 1. OECD. (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168; 2. OECD. (2015). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA); 3. OECD. (2015). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 442D: In vitro Skin Sensitization: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method.; 4. OECD. (2016). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 442E: In vitro Skin Sensitization: human Cell Line Activation Test (h-CLAT); 5. OECD. (2016). 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. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development; 6. Kiken, DA, Cohen, DE (2002). Am J Contact Dermat., 13, 148; 7. Jaworska, JS et al. (2015). Arch. Toxicol., 89, 2355.



**Fig. 2** Risk assessment flow for botanical extract

## 論文審査の結果の要旨

西條 拓氏から提出された論文「化粧品原料の皮膚感作性に対する動物を用いない評価技術の適用と実践」は、化学構造既知の化粧品原料について、その感作性と感作強度を *in vitro* 試験法を基軸にベイジアンネットワークなどと組み合わせて予測するシステムの構築を目指したもので、2編構成となっている。第1編では高純度単一物質を対象に、第1章では *in vivo* 試験データと比較することによる *in vitro* 試験法の組み合わせの感作性検出の定性的適妥当性を評価し、第2章では Bayesian Network Integrated Testing Strategy (BN ITS-3) による感作強度の予測を行い、*in vivo* 試験データとの比較から、その定量的妥当性を評価している。第2編では実際の化粧品原料に頻用される混合物（植物エキス）を対象に、*in vitro* 試験法を基軸とした予測システムの構築とその適用性を評価している。

皮膚感作性を評価する動物実験代替法として、皮膚感作性過程の初期の3つのキーイベントである、物質のタンパク結合性、角化細胞活性化、樹状細胞活性化、に着目した *in vitro* 試験法があり、それぞれ direct peptide reactivity assay (DPRA)、KeratinoSens™、human cell line activation test (h-CLAT) として開発されてきた。これらの *in vitro* 試験法の組み合わせや、*in silico* データを加えた感作性の予測が試みられているが、感作の予測性が不十分であり、効率的な試験システムとしての標準化は行われていない現状がある。第1編第1章では、構造既知物質における既報の上記の3つの *in vitro* 試験法のデータセットを入手し、さらに数種の物質については本研究で測定した3つの *in vitro* 試験データを加え、合計203物質のデータセットを解析に利用している。このデータセットを既報の *in vivo* 試験データ（動物実験）である local lymph node assay (LLNA) と比較した結果、KeratinoSens™、h-CLAT の2試験の組み合わせが感作性予測の高い感度を示すことを見出している。203物質のうちヒト試験データが入手可能な97物質の解析においても、同様の結果を得ている。この2試験の組み合わせの感度は、3種の試験を全て組み合わせた場合の感度と比べて遜色がなく、感作性評価の効率化への寄与が期待できる。一方で、2試験の組み合わせでは偽陰性と判定される物質の性質が、LogKow が3.5以上、pre-/pro-hapten、アシル転移誘導物質、アミン反応性物質であることを明らかにし、これらの物質群に関しては DPRA を加えた3試験の組み合わせが必要であると結論づけている。以上を小括して第1章では、高純度単一物質について、2種の *in vitro* 試験法の組み合わせを主軸にした定性的感作評価のリスクアセスメントフローを提案するに至っている。

化粧品原料を評価するにあたっては、感作性の有無といった定性的な予測に加えて、感作強度といった定量的な予測が必要となる。しかし、動物を用いない感作強度の予測に基づくリスクアセスメント法ははまだ明確化されておらず、実際の化粧品の評価において課題となっている。第2章では、BN ITS-3 による感作強度予測に基づくリスクアセスメントの実現を目的に検討を行っている。BN ITS-3 は物質の種々の物理化学的物性値、上記3種の *in vitro* 試験から算出される感作強度および細胞毒性に関する定量値などのパラメーターを関連付けてさらに重み付けを行い、感作強度を確率論的に予測するシステムである。本研究において、175物質の BN ITS-3 による感作強度予測の結果、BN ITS-3 の予測性限界となりうる物質（アシル転移誘導物質、アミン反応性物質、難水

溶性物質、pre-/pro-hapten) を除外すれば、LLNA による感作強度と高い相関性を示すことを明らかにしている。さらに、BN ITS-3 による過小評価の可能性を最小化するための新たな感作強度分類を定義している。以上をふまえ、第1編では KeratinoSens™ と h-CLAT の組み合わせと BN ITS-3 に基づく定性的・定量的リスクアセスメントフローの構築を達成している。

化粧品においては植物エキスを原料とすることも多く、抽出した植物エキス中には感作性を有する物質も存在して接触皮膚炎を引き起こす恐れがある。第2編では、植物エキス中の感作性物質に対する動物を用いない評価技術の適用性検証とリスクアセスメント戦略の構築を行っている。第1章では、*in vitro* 試験法の植物エキスへの適用性を検証すべく、感作性物質を検出する際の検出感度について LLNA と *in vitro* 試験法の比較を行っている。ここでも、*in vitro* 試験法として KeratinoSens™ と h-CLAT の組み合わせを用いている。感作性物質 146 種を解析対象とした結果、*in vitro* 試験法では、植物エキスを LLNA と同等以上の検出下限で評価できる可能性を見出している。一方で、*in vitro* 試験法の方が感度が低く、偽陰性判定とってしまう可能性があるものは、油性や細胞毒性を示すエキスであることを明らかにしている。そこで2章では、*in vitro* 試験法によるハザード評価に加えて、感作閾値 (dermal sensitization threshold, DST) の概念をふまえた感作リスクアセスメント戦略を検討している。また、植物エキスに含まれる感作性物質については、その最大含有濃度が予想でき、さらに、感作性の誘導には閾値 (no expected sensitization induction level (NESIL)) が存在することを考慮し、*in vitro* 試験法で陰性となった植物エキスの NESIL (botanical NESIL) を算出している。その上で、*in vitro* 試験法で陰性となった植物エキスの DST (botanical DST) を提案し、最終的に、植物エキスの感作リスクアセスメントフローを構築するに至っている。さらに、構築したフローについてケーススタディを行い、ハンドソープなどの化粧品への高い適用性を実証している。

本研究の背景として、化粧品の開発においては、近年、倫理上・法規制上の観点から動物を用いない評価が求められており、動物実験代替法の開発が急務となっている点が挙げられる。また、物質に触れることによって引き起こされるアレルギー性接触皮膚炎はしばしば生活者の QOL の低下を引き起こすことから、本研究では、化粧品や医薬品に配合する物質の安全性評価において重要な評価項目である皮膚感作性を取り上げている。これらは、現在の化粧品開発における最重要課題であり、本研究がその解決に向けた手法を提案しようとする試みは、学術的にも社会的にも重要な意義を持つものと評価できる。本研究では、高純度単一物質にとどまらず、植物エキスといった混合物の感作ハザードの有無および強度の予測に *in vitro* 試験法を基軸としたリスクアセスメント戦略を構築し、さまざまな化粧品原料を網羅的に評価する道筋を提案するに至っている。本成果は、化粧品原料の動物を用いない評価の精緻化と実運用に大きく寄与するものと考えられ、化粧品の開発研究分野において極めて意義深く、内容も新規性および創造性に富んでいると判断される。以上を総合的に考慮した結果、本論文は博士 (薬科学) の論文として十分価値のあるものと判断した。