

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

略語

AEL	Acceptable Exposure Level
ANN	Artificial neural network
AOP	Adverse outcome pathway
BN ITS	Bayesian network Integrated Testing Strategy
CEL	Consumer Exposure Level
DCh	Detection Concentration of h-CLAT
DCK	Detection Concentration of KeratinoSens™
DPRA	Direct peptide reactivity assay
DST	Dermal Sensitization Threshold
EC1.5	Estimated concentration of Induction=1.5
EC3	Estimated concentration of SI=3
GPMT	Guinea pig maximization test
h-CLAT	human cell line activation test
HMT	Human maximization test
HRIPT	Human repeated insult patch test
ITS	Integrated testing strategy
LLNA	Local lymph node assay
MDC	Minimal detection concentration
MIT	Minimal Induction Threshold
NESIL	No Expected Sensitization Induction Level
NOEL	No observed effect levels
RFI	Relative fluorescence intensity
SAF	Sensitization Assessment Factor
SCCS	Scientific Committee on Consumer Safety
SCCS	Scientific Committee on Consumer Safety
STS	Sequential testing strategy
TIMES	Tissue metabolism stimulator
TTC	Threshold of Toxicological Concern
WoE	Weight-of-evidence

目次

略語	2
緒言	5
第 1 編 高純度単一物質の皮膚感作性に対する動物を用いない評価技術の適用性検証と実践	8
第 1 章 高純度単一物質の皮膚感作性に対する KeratinoSens™ と human cell line activation test (h-CLAT) の組み合わせによる感作性評価技術の適用性検証	8
第 1 節 実験	9
1. 203 物質のデータセット	9
2. 動物を用いない試験法	9
第 2 節 結果	12
1. LLNA とヒトデータに対する Integrating testing strategy (ITS) の予測精度	12
2. KeratinoSens™ と h-CLAT の組み合わせにおける偽陰性物質	16
3. DPRA におけるシステイン反応性およびリジン反応性の物質に対する KeratinoSens™ および h-CLAT の感度	18
第 3 節 考察	20
第 4 節 小括	25
第 5 節 Table 1-1-6 203 物質のデータセット	26
第 2 章 Bayesian network Integrated Testing Strategy (BN ITS-3) を用いたリスクアセスメント技術の構築と実践	30
第 1 節 実験	31
1. BN ITS-3	31
2. 175 物質のデータセット	32
3. 動物を用いない試験法	32
第 2 節 結果	34
1. BN ITS-3 による感作強度予測性	34
2. BN ITS-3 で過小評価した物質	36
3. 新規感作強度予測分類の定義を用いたリスクアセスメントフロー	39
4. 香料原料を用いたケーススタディ	41
第 3 節 考察	43
第 4 節 小括	45
第 2 編 植物エキスの皮膚感作性に対する動物を用いない評価技術の適用性検証と実践	

.....	46
第1章 植物エキス中の感作性物質の検出能力検証	46
第1節 実験	48
1. 146物質のデータセット	48
2. 植物エキス中に含有されうる感作性物質の検出下限	48
第2節 結果	52
1. 感作性物質の検出下限の比較	52
2. h-CLAT における植物エキス中の他成分による影響検証	57
第3節 考察	59
第4節 小括	62
第5節 Table 2-1-5 146物質のデータセット	63
第2章 <i>In vitro</i> 評価技術と感作閾値の統合による植物エキスのリスクアセスメント技術 の構築と実践	66
第1節 実験	68
1. 解析対象：KeratinoSens™、h-CLAT で LLNA に対して正しく陽性と判定した 146 物質	68
2. アプローチ	68
第2節 結果	73
1. MDC/EC3 比	73
2. KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせで陰性の植物エキスの DST (Botanical DST)	75
3. ケーススタディ	82
第3節 考察	84
第4節 小括	87
結語	88
引用文献	91
謝辞	99

緒言

アレルギー性接触皮膚炎は、皮膚感作性物質に触れることによって引き起こされる皮膚疾患であり、しばしば労働者や消費者の *quality of life* を低下させる。そのため皮膚感作性は、化粧品や医薬品に配合される物質の安全性評価において重要な評価項目である。

これまで、皮膚感作性の評価は *guinea pig maximization test*¹⁾ や *local lymph node assay* (LLNA)²⁾ などの動物実験を用いて行われてきたが、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いる。そのような背景の下、皮膚感作性の動物実験代替法としては、皮膚感作過程の *adverse outcome pathway* (AOP) の初期の3つのキーイベント³⁾ である、①タンパク結合性、②角化細胞活性化、および③樹状細胞活性化に着目した *in vitro* 試験法が個々に開発されてきた。すなわち、タンパク結合に着目した *direct peptide reactivity assay* (DPRA)^{4,5)}、角化細胞活性化に着目した *KeratinoSens*^{TM 6)}、樹状細胞活性化に着目した *human cell line activation test* (h-CLAT)⁷⁾ が開発され、高純度・単一物質の評価に対する施設内再現性・施設間再現性・予測性・適用範囲などを検証した上で、それぞれ OECD テストガイドラインとして収載されるようになった⁸⁾。しかし、これらの *in vitro* 試験は、AOP におけるキーイベントの1つしか反映されていない点や予測性の観点から単独では十分でないため、より高精度な評価の実現に向けて、複数の *in vitro* 試験に加え、物理化学的性状や *in silico* データも含めた情報を組み合わせる検討が、近年盛んに行われてきた⁹⁾。

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。ここで、定量的リスクアセスメントアプローチは、評価物質の感作強度と暴露量の2つの因子から成っており、次の3つのステップに基づいて行われている¹⁰⁾。まず初めに、評価物質の感作性強度をヒトへの非感作誘導濃度 (*no expected sensitization induction level*, NESIL) を指標として決定する。これは通常単位面積当たりの暴露量として表され、LLNA の *estimated concentration of stimulation index=3* (EC3) の値から推算することができる¹¹⁾。ここで、EC3 は LLNA の結果に基づいて、陽性判定基準である *stimulation index* (SI) が3となる前後の濃度 (C_a, C_b ; $C_a > C_b$) および SI (SI_a, SI_b ; $SI_a > SI_b$) に以下の式を適用することで導出される： $EC3 = \text{Log}_{10}C_b + ([3-SI_b]/[SI_a-SI_b]) \times (\text{Log}_{10}C_a - \text{Log}_{10}C_b)$ 。次に、個人差、溶媒影響、さらには使用状況を反映するための感作アセスメント係数 (*Sensitization Assessment Factor*, SAF)^{12,13)} の適用を行うことで、ヒトで感作を誘導しないと考えられる許容暴露量 (*acceptable exposure level*, AEL) を算出する。最後に、消費者暴露量 (*consumer exposure level*, CEL) の算出を行う。ここで、CEL は *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCS) などから報告されている標準的な暴露シナリオに基づいて算出することが可能である¹⁴⁾。ある物質において $AEL > CEL$ となれば、その CEL ではヒトで感作を誘導しないと考えられるため、皮膚感作性のリスクは小さいとアセスメントすることが可能である。さらに、暴露量が少ない場合には、

動物実験を行わないリスクアセスメントとして **dermal sensitization threshold (DST)** が提案されてきた^{11, 15, 16)}。DST は、あらゆる化学物質についてそれ以下の暴露量では明らかな有害影響が現れないとするヒト暴露量の閾値である **threshold of toxicological concern (TTC)** の考え方¹⁷⁾を基に開発されたもので、感作性評価を行っていない化学物質に対しても大きな感作リスクを生じない皮膚暴露量が提案されてきた。Safford らはタンパク質との結合性が高い化学物質に対して DST アプローチを適用した¹⁶⁾。この報告では、**high potency category chemicals** として定義される特定の反応構造を有する化学物質を除いた上で大きな感作リスクを生じない閾値として **Reactive DST 64 µg/cm²**を提案した¹⁸⁾。

一方、化粧品原料のリスクアセスメントは、標準化された手順ではなく、ケースバイケースに検討されるもので、**weight-of-evidence (WoE)** アセスメントとして複数の情報を総合的に考慮して行うことが提案されてきた¹⁹⁾。Goebel らの報告によると、WoE に基づく皮膚感作性のアセスメントにおいて考慮される情報として、(1) 物理化学的特性に基づいた予測、(2) 毒性情報の入手が可能な化学構造類似物質との **read-across**、(3) **in vitro** 試験法、(4) 動物実験結果やヒト試験結果などの過去の試験結果、(5) 暴露量予測、および (6) 定量的リスクアセスメントの結果が挙げられている。実際の WoE に基づく皮膚感作性のアセスメントにおいては、これらの情報全てではなく、得られる最大限の情報に基づいて、科学的根拠に基づいて行われる必要がある。

以上をふまえ、本研究では、これらリスクアセスメント技術の化粧品原料に対する有用性を明確化し、さらに実践に向けた評価フローの提案を行った。実際の化粧品原料を評価するにあたっては、感作ハザードの有無の精緻な予測に加えて、感作リスクアセスメントに向けた感作強度の予測も必要となる。しかし現状では、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のアプローチは明確化されておらず、このことが実際の化粧品の評価において課題となっている。さらに、化粧品においては、水、**ethanol** や **1,3-butylene glycol** などの溶媒に植物から成分を抽出した植物エキスなど、天然由来の複雑な混合物が数多く配合されている。特に、いくつかの植物エキス中には皮膚感作性を有する物質が存在し、それらが接触皮膚炎を引き起こす恐れがあることが報告されている^{20, 21)}。また、感作性物質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、複雑な混合物である植物エキス中の感作性物質を **non-target** の網羅分析から定性・定量することは多くの時間を要し、困難である。そのため、動物を用いない試験法を用いた植物エキスの評価が求められている。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に加え、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に関する研究も行うことで、さまざまな化粧品原料を評価の実現を目指した。

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 DPRA、KeratinoSens™、および h-CLAT を組み合わせることによる高感度なハザード検出に向けた検討を行った。さらに第2章では、Bayesian Network Integrated Testing Strategy (BN ITS-3) を用いた感作強度予測に基づく定量的リスクアセスメントの実現を目的に、新規評価システムの構築を行った。

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、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を検証すべく、感作性物質以外の成分が検出下限に影響を与えないことを前提に、感作性物質の検出濃度について代替法と動物実験である LLNA 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代替法である KeratinoSens™ と h-CLAT を組み合わせた評価を実施した。h-CLAT と KeratinoSens™、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、各感作性物質について、LLNA での検出濃度 (EC3) と代替法での検出濃度を比較した。第2章では、代替法によるハザード評価に加えて、暴露量の観点からアプローチすることで、感作リスクアセスメントを行うことを試みた。そこで、本研究では次の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。植物エキスが感作性試験で陽性と判定されるということは、評価した植物エキス中に感作性物質が検出下限以上で含まれていることを意味する。言い換えれば、感作性試験で陰性であれば、仮に感作性物質が含まれていたとしても、その濃度は感作性試験の検出下限未満である。すなわち、LLNA と比べ、当代替法の検出下限の方が高い感作性物質が植物エキス中に存在するとしても、代替法で陰性となった植物エキスに含まれる感作性物質の濃度は、その検出下限未満であると予想できた。2点目は、感作性の誘導には閾値が存在し、NESIL が存在する点であった。植物エキス中の感作性物質の最大含有濃度と NESIL という2点をふまえて、代替法で陰性となった植物エキスの NESIL (botanical NESIL) を算出した。さらに、botanical NESIL を未知の成分を含む植物エキスへ適用するアプローチも検討した。

以上、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と、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に関する研究を行った。

第 1 編 高純度単一物質の皮膚感作性に対する動物を用いない評価技術の適用性検証と実践

第 1 章 高純度単一物質の皮膚感作性に対する KeratinoSensTM と human cell line activation test (h-CLAT) の組み合わせによる感作性評価技術の適用性検証

最近報告された 2 out of 3 Integrated Testing Strategy (ITS) は、DPRA、KeratinoSensTM、および h-CLAT の結果を用いて、3 試験のうち 2 試験以上で陽性が得られた場合に「感作性物質」と判定し、3 試験のうち 2 試験以上で陰性が得られた場合に「非感作性物質」と判定するアプローチである。すなわち 2 out of 3 ITS では、まず 2 試験を行い、相反する結果が得られた際に 3 試験目を実施する²²⁻²⁵。ヒトデータに対する LLNA の予測性(一致率)が 80%程度であるのに対し、ヒトデータに対する 2 out of 3 ITS の一致率は 90%程度であり、LLNA よりも 2 out of 3 ITS のほうがやや高い予測性を示した²⁵。しかしこのアプローチでは DPRA、KeratinoSensTM、および h-CLAT の 3 試験法の重み付けがなされておらず、どのようにして 3 試験のうち 2 試験を選択して実施するかが明確ではない。特に、DPRA、KeratinoSensTM、および h-CLAT の 3 試験法はそれぞれ皮膚感作過程の AOP の初期の 3 つのキーイベントに着目したものであり、実際にはそれぞれ反映しているキーイベントは重複している。感作性物質はタンパク質に対して求電子的に結合する化学構造を有していることが知られている。実際に、DPRA および KeratinoSensTM はともに、システインペプチドのリジン基に対する結合のようなタンパク結合性を考慮した試験法である²⁶。加えて、システインペプチドやリジンペプチドへの結合は MAPK Pathway の活性化への誘因となることが知られており、h-CLAT における樹状細胞活性化におけるキー因子である^{27,28}。このように、細胞培養系の試験法である KeratinoSensTM および h-CLAT も、DPRA と同様化学物質の反応性に依存している。したがって、AOP の初期の 3 つのキーイベントのうち、KeratinoSensTM (②角化細胞活性化) と h-CLAT (③樹状細胞活性化) の組み合わせによって、①タンパク結合性についても加味した評価が可能である。このような理由から、著者は KeratinoSensTM と h-CLAT の組み合わせによって最も単純に AOP の初期の 3 つのキーイベントを反映した評価を行うことができると考えた。そこで、皮膚感作性のハザード予測において被験物質を非感作性物質であることを明確化するボトムアップアプローチの 1 つとして、KeratinoSensTM と h-CLAT の組み合わせについて検討した。

第1節 実験

1.203 物質のデータセット

既報のデータセット^{25, 29)}に別の研究のデータセットで報告された22物質³⁰⁾を加えて、データセットを構築した。Urbisch *et al*, 2015 では213物質のデータが報告されているが、その中には動物を用いない試験法の全てのデータが入手できないものや、3つの試験法のうち最低2種類の物質しか入手できないものが含まれていた²⁹⁾。そこで本章では、Joanna ら (2015) で報告されているデータセットを追加した³⁰⁾。さらに、3-methyl-1-phenylpyrazolone と streptomycin sulfate について、未報告の h-CLAT データを加えた。本章第5節 Table 1-1-6 に、データセットをまとめて示す。

2. 動物を用いない試験法

2-1. Direct peptide reactivity assay (DPRA)

DPRA は、皮膚感作性の AOP のうちタンパク結合性に着目し、2種類の合成ペプチド (システインペプチド Ac-RFAACAA-COOH およびリジンペプチド Ac-RFAAKAA-COOH) を用いて、被験物質との結合性を評価する試験法である^{4, 5, 31)}。システインペプチドとリジンペプチドをそれぞれ 1 : 10 および 1 : 50 で被験物質と混和し、24時間のインキュベーションの後に HPLC を用いて測定し、システインペプチドとリジンペプチド量を評価した。それぞれの合成ペプチドの減少率を算出した上で、2つの合成ペプチドの平均減少率が >6.38% となった際に陽性と判定した。本陽性判定基準値は、データセットにおけるそれぞれの合成ペプチドの減少率に基づいて、一致率が最も高くなるような最適化に基づいて設定された⁵⁾。

2-2. KeratinoSens™

KeratinoSens™ は角化細胞活性化に着目し Keap1-Nrf2-ARE pathway の活性化を評価する試験法である^{6, 32)}。ヒト表皮角化細胞株 HaCaT における antioxidant response element (ARE) 活性化をルシフェラーゼ活性測定によって評価するレポーターアッセイである。HaCaT 10⁴ cells を試験物質と共に 96 ウェルプレートに播種し、37°C、5% CO₂ の条件で 48 時間培養した後、ルミノメーターでルシフェラーゼ生成量を測定した。被験物質を 1000 μM (分子量不明の場合には 400 μg/mL) 未満の濃度で培養液に溶解した上で暴露し、溶媒コントロールに対し 1.5 倍以上のルシフェラーゼ遺伝子活性化が認められた際に、陽性と判定した。本陽性判定基準値は、データセットにおけるルシフェラーゼ活性測定に基づいて、一致率が最も高くなるような最適化に基づいて設定された⁶⁾。

また、内挿法により、ルシフェラーゼ遺伝子活性化が 1.5 倍を超えると推定される濃度 estimated concentration of 1.5-fold luciferase induction (EC1.5) を算出し、感作強度の

指標とした。ここで、EC1.5 はルシフェラーゼ活性測定の結果に基づいて、陽性判定基準であるルシフェラーゼ生成量が 1.5 となる前後の濃度 ($C_a, C_b; C_a > C_b$) および SI ($SI_a, SI_b; SI_a > SI_b$) に以下の式を適用することで導出される： $EC1.5 = \text{Log}_{10}C_b + ([1.5-SI_b]/[SI_a-SI_b]) \times (\text{Log}_{10}C_a - \text{Log}_{10}C_b)$ 。

2-3. Human cell line activation test (h-CLAT)

h-CLAT は、樹状細胞活性化に着目した試験である。樹状細胞は、感作性物質に暴露されると CD54, CD86 などの表面分子の発現が上昇する³³⁾。h-CLAT はこの現象に着目し、樹状細胞と同様の挙動を示す THP-1 細胞を用いて CD54, CD86 の発現上昇を測定する^{7, 34)}。THP-1 細胞は $1 \times 10^5 - 2 \times 10^5$ cells/mL、37°C、5% CO₂ の条件で 48-72 時間前培養の後、被験物質に暴露した。被験物質を細胞 1×10^6 cells/mL、1 mL/ウェルで播種した 24 ウェルプレート中で 24 時間暴露した上で、CD86, CD54 の発現量を蛍光標識した抗体で染色して評価した。この際、細胞生存率 cell viability が 75% になる暴露濃度 (CV75) をあらかじめ決定し、それに基づいて設定された濃度で培養液に溶解した上で、評価を行った。細胞毒性を生じない被験物質については、溶媒が生理食塩液の際には 5000 µg/mL (Dimethyl sulfoxide の際には 1000 µg/mL) を最高暴露濃度として試験を実施した。CD86, CD54 の発現変動はフローサイトメトリーを用いて測定し、溶媒コントロール暴露群に対する相対的な発現量 (relative fluorescence intensity: RFI) を測定した。その上で、CD86 については RFI が 150% 以上、CD54 については RFI が 200% 以上であれば、被験物質は陽性として判定した。本陽性判定基準値は、データセットにおけるルシフェラーゼ活性測定に基づいて、一致率が最も高くなるような最適化に基づいて設定された⁷⁾。CD86, CD54 について RFI がそれぞれ 150%, 200% を超えると推定される濃度を、EC150, EC200 として算出し、その 2 つ EC 値のうち小さい方を minimal induction threshold (MIT) として選択した。この際、EC150, EC200 は LLNA の EC3 や KeratinoSensTM の EC1.5 と同様の手順で算出した。

2-4. KOWWIN ver.4.1 in EPI suiteTM

被験物質の LogKow は、KOWWIN ver.4.1 in EPI suiteTM (environmental Protection Agency, Washington, DC, USA) を用いて予測した。LogKow はそれぞれの化学物質の水溶性の指標として用いた。

2-5. Tissue metabolism stimulator for predicting skin sensitization (TIMES-SS) ver.2.27.17

TIMES (Laboratory of Mathematical Chemistry, Bourgas, Bulgaria) は、皮膚感作性を含む複数のエンドポイントにおける予測システムを搭載したソフトウェアパッケージである。TIMES-SS は皮膚代謝・自動酸化による化学構造変化を反映した感作性 (化学構

造アラート) と、強度分類 (非感作性・弱感作性・強感作性の 3 分類) を予測できる (Patlewicz *et al.*, 2007, 2014)。TIMES-SS は pre-hapten (感作性物質となる際に自動酸化により活性化を要する化学物質) と pro-hapten (感作性物質となる際に酵素による活性化を要する化学物質) を特定する際に用いた。

2-6.統計解析

組み合わせによる予測性の検証にあたって、Cooper 統計³⁵⁾に基づき、感作性物質を陽性として判定する割合である感度、非感作性物質を陰性として判定する割合である特異度、および正しい予測を行う割合である一致率を、下記の式に基づいて算出した。

$$\text{感度} = \text{真陽性物質数} / (\text{真陽性物質数} + \text{偽陰性物質数})$$

$$\text{特異度} = \text{真陰性物質数} / (\text{真陰性物質数} + \text{偽陽性物質数})$$

$$\text{一致率} = (\text{真陽性物質数} + \text{真陰性物質数}) / (\text{真陽性物質数} + \text{真陰性物質数} + \text{偽陽性物質数} + \text{偽陰性物質数})$$

第2節 結果

1. LLNA とヒトデータに対する Integrating testing strategy (ITS) の予測精度

本章第5節 Table 1-1-6 に 203 物質のデータセットとその物理化学的性質や LLNA、DPRA、KeratinoSens™、h-CLAT、および TIME-SS を感作強度順に示す。203 物質のうち 97 物質についてはヒトデータが入手可能であった。動物を用いない試験法の LLNA とヒトデータに対する予測性を Table 1-1-1 に示す。DPRA は感度 71.5% (vs. LLNA) と 84.7% (vs. ヒトデータ)、特異度 71.2% (vs. LLNA) と 80.0% (vs. ヒトデータ)、および一致率 71.4% (vs. LLNA) と 83.5% (vs. ヒトデータ) を示した。KeratinoSens™ は感度 74.2% (vs. LLNA) と 82.0% (vs. ヒトデータ)、特異度 59.6% (vs. LLNA) と 72.0% (vs. ヒトデータ)、および一致率 70.4% (vs. LLNA) と 79.4% (vs. ヒトデータ) を示した。さらに、h-CLAT は感度 82.1% (vs. LLNA) と 88.9% (vs. ヒトデータ)、特異度 65.4% (vs. LLNA) と 68.0% (vs. ヒトデータ)、および一致率 77.8% (vs. LLNA) と 83.5% (vs. ヒトデータ) を示した。

以上より、DPRA、KeratinoSens™、および h-CLAT は LLNA およびヒトデータに対して同等の一致率を示した。一方で、ヒトデータが入手可能であった 97 物質に対して動物を用いない試験法と LLNA の予測性 (Table 1-1-2) を比較すると、LLNA の感度 (91.7%) は単独の動物を用いない試験法の感度 (84.7~88.9%) と比較してやや高かった。

Table 1-1-1

LLNA およびヒトデータに対する動物を用いない試験の予測性

LLNA	DPRA		KeratinoSens™		h-CLAT	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
151 sensitizers	108	43	112	39	124	27
52 non-sensitizers	15	37	21	31	18	34
Sensitivity (%)	71.5		74.2		82.1	
Specificity (%)	71.2		59.6		65.4	
Accuracy (%)	71.4		70.4		77.8	

human	DPRA		KeratinoSens™		h-CLAT	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
72 sensitizers	61	11	59	13	64	8
25 non-sensitizers	5	20	7	18	8	17
Sensitivity (%)	84.7		82		88.9	
Specificity (%)	80.0		72.0		68.0	
Accuracy (%)	83.5		79.4		83.5	

DPRA、KeratinoSens™、および h-CLAT の結果を用いて、3 試験のうち 2 試験以上で陽性が得られた場合に「感作性物質」と判定するアプローチである 2 out of 3 ITS は、感度 78.8% (vs. LLNA) と 88.9% (vs. ヒトデータ)、特異度 71.2% (vs. LLNA) と 84.0% (vs. ヒトデータ)、および一致率 76.8% (vs. LLNA) と 87.6% (vs. ヒトデータ) を示した。この予測性は h-CLAT 単独の予測性とほぼ同等であった (Table 1-1-1 および Table 1-1-2)。また、KeratinoSens™ と h-CLAT の組み合わせ (2 試験法のうちいずれか 1 試験で陽性として結果が得られた場合に「感作性物質」と判定し、2 試験ともに陰性が得られた場合に「非感作性物質」と判定するアプローチ) についても予測性を検証した結果、KeratinoSens™ と h-CLAT の組み合わせでは、感度 93.4% (vs. LLNA) および 94.4% (vs. ヒトデータ) を示し、感作性物質に対して 2 out of 3 ITS よりも高い予測性を示した (Table 1-1-2)。他の 2 試験の組み合わせ (DPRA と KeratinoSens™、DPRA と h-CLAT) についても KeratinoSens™ と h-CLAT の組み合わせと同等の感度を示したが、DPRA、KeratinoSens™、および h-CLAT の 3 試験の組み合わせ (3 out of 3 ITS) については 2 out of 3 ITS に比べて特異度が低くなる傾向が認められた。ここで、3 out of 3 ITS は、3 試験のうちいずれかで陽性が得られた場合に「感作性物質」と判定し、3 試験全てで陰性が得られた場合に「非感作性物質」と判定するアプローチであった (Table 1-1-2)。3 out of 3 ITS は、今回検討した中で最も高い感度を示し、96.7% (vs. LLNA) および 100% (vs. ヒトデータ) であった。一方で特異度については、今回検討した中で最も低く、28.8% (vs. LLNA) および 36% (vs. ヒトデータ) であった。

Table 1-1-2

LLNA とヒトデータに対する各 Integrating testing strategy (ITS) の予測精度

LLNA	Binary test battery of KeratinoSens™ and h-CLAT		2 out of 3		Binary test battery of DPRA and h-CLAT		Binary test battery of DPRA and KeratinoSens™		3 out of 3			
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
151 sensitizers	141	10	119	32	139	12	131	20	146	5		
52 non-sensitizers	33	19	15	37	26	26	30	22	37	15		
Sensitivity (%)		93.4		78.8		92.1		86.8		96.7		
Specificity (%)		36.5		71.2		50.0		42.3		28.8		
Accuracy (%)		78.8		76.8		81.3		75.4		79.3		

human	Binary test battery of KeratinoSens™ and h-CLAT		2 out of 3		Binary test battery of DPRA and h-CLAT		Binary test battery of DPRA and KeratinoSens™		3 out of 3		LLNA	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
72 sensitizers	68	4	64	8	71	1	69	3	72	0	66	6
25 non-sensitizers	14	11	4	21	11	14	11	14	16	9	9	16
Sensitivity (%)		94.4		88.9		98.6		95.8		100		91.7
Specificity (%)		44.0		84.0		56.0		56.0		36.0		64.0
Accuracy (%)		81.4		87.6		87.6		85.6		83.5		84.5

2. KeratinoSens™ と h-CLAT の組み合わせにおける偽陰性物質

Table 1-1-3 に LLNA およびヒトデータに対する、KeratinoSens™ と h-CLAT の組み合わせにおける 11 の偽陰性物質をまとめた。11 の偽陰性物質のうち、methyl pyruvate、clotrimazole、1-cyclohexylethyl 2-butenolate、N,N-dibutylaniline、および 1-octen-3-yl acetate は LLNA で陽性であったのに対し、KeratinoSens™ と h-CLAT の組み合わせに加えて、3 out of 3 ITS でも偽陰性であった。一方、benzoyl peroxide、squaric acid、および diethylenetriamine は LLNA とヒトデータで一致した結果が得られた。さらに、phthalic anhydride は LLNA における陽性の結果だけでなく、陰性のヒトデータも得られた³⁶⁾。1,2-Cyclohexane dicarboxylic anhydride は LLNA で陽性であったが、信頼に足るヒトデータが得られなかった。Kanamycin は LLNA では陰性であったが、ヒトデータでは陽性を示した。Benzoyl peroxide、squaric acid、diethylenetriamine、phthalic anhydride、1,2-cyclohexane dicarboxylic anhydride および kanamycin は、DPRa で陽性であった。

Table 1-1-3**Keratisens™ と h-CLAT の組み合わせにおける偽陰性物質**

Chemical name	CAS#	LLNA EC3	Human*	Discussion
<i>Group 1; LLNA (P), Human (No data), Binary test battery (N), DPRA (N)*</i>				
Methyl pyruvate	600-22-6	2.4	ND	Undergo hydration in aqueous assay solution (Pocker et al., 1982)
Clotrimazole	23593-75-1	4.8	ND	LogKow = 6.26. Putative pro-hapten.
1-Cyclohexylethyl 2-butenate	68039-69-0	5.53	ND	LogKow = 4.32
N,N-Dibutylaniline	613-29-6	19.6	ND	LogKow = 5.12
1-Octen-3-yl acetate	2442-10-6	30	ND	LogKow = 3.6
<i>Group 2; LLNA (P / N), Human (P / N / No data), Binary test battery (N), DPRA (P)*</i>				
Benzoyl peroxide	94-36-0	0.22	P	Acyl transfer agent, amine reactive chemical (Riroid et al., 2015; Natsch et al., 2015)
Squaric acid	2892-51-5	4.3	P	Amine reactive chemical (Natsch et al., 2013)
Diethylenetriamine	111-40-0	5.8	P	Putative pro-hapten
Phthalic anhydride	85-44-9	0.16	N	Acyl transfer agent, amine reactive chemical (Natsch et al., 2015)
1,2-cyclohexane dicarboxylic anhydride	85-42-7	0.84	ND	Acyl transfer agent, amine reactive chemical (Natsch et al., 2015)
Kanamycin	8063-7-8	- (Negative)	P	Known contact allergen in human after considerable exposure (Urbisch et al., 2015)

3. DPRA におけるシステイン反応性およびリジン反応性の物質に対する KeratinoSens™ および h-CLAT の感度

システインやリジンのようなアミノ酸に対する感作性物質の反応性は、KeratinoSens™ および h-CLAT における陽性反応と関連がある。そこで本章では、KeratinoSens™ および h-CLAT の結果と、DPRA におけるシステインペプチドとリジンペプチドの結果との関連性について検証した。

OECD テストガイドライン 442C に記載されている予測モデルに基づいて、システインペプチドで 13.89% より大きな減少が認められた感作性物質を、DPRA におけるシステイン反応性物質と定義した。また、陽性判定基準である 2 つの合成ペプチドの平均の減少率 6.38% の 2 倍の値に基づいて、リジンペプチドで 12.76% より大きな減少が認められた感作性物質を、DPRA におけるリジン反応性物質と定義した。次に、この定義に基づいて解析を行ったところ、LLNA またはヒトデータで陽性が得られた 157 の感作性物質のうち、101 のシステイン反応性物質と 51 のリジン反応性物質が存在した (Table 1-1-4)。さらに、101 のシステイン反応性の感作性物質のうち 86 物質については、KeratinoSens™ で陽性となり、81 物質については h-CLAT で陽性となった。この結果 (81/86 物質) から、KeratinoSens™ と h-CLAT はシステイン反応性の感作性物質に対して同等の予測性を示すことが明らかになった。また、h-CLAT における CD86 と CD54 のシステイン反応性の感作性物質に対する感度は同等であった (Table 1-1-4)。さらに、51 のシステイン反応性の感作性物質のうち 42 物質については KeratinoSens™ で陽性となり、46 物質については h-CLAT で陽性となった。この結果から、h-CLAT は KeratinoSens™ と比べて、リジン反応性の感作性物質に対して高い予測性を有することが示唆された。

また、h-CLAT における CD86 と CD54 のリジン反応性感作性物質に対する感度は同等であった (Table 1-1-4)。これらの結果から、KeratinoSens™ と h-CLAT はシステイン反応性感作性物質とリジン反応性感作性物質に対して高い予測性を有することが示された。さらに、リジンペプチドと特に高い反応性 (減少率 >12.76%) を示す一方でシステインペプチドとは反応しない (減少率 <13.89%) 感作性物質 7 物質を Table 1-1-5 に示す。OECD テストガイドライン 442D において予測性限界として記載されているように、KeratinoSens™ はリジンペプチドに高い反応性を示す 7 つの感作性物質のうち 4 物質 (3,4-dihydrocoumarin, pentachlorophenol, phthalic anhydride および trimellitic anhydride) において偽陰性判定を示した。対照的に、h-CLAT では phthalic anhydride を除く 6 物質で正しく陽性と判定し、KeratinoSens™ よりリジン反応性感作性物質に対して高い予測性を示した。

Table 1-1-4

DPRA におけるシステイン反応性およびリジン反応性の物質に対する KeratinoSens™および h-CLAT の感度

Reactivity in DPRA	Positive response in KeratinoSens™ (Ratio)	Positive marker(s) in h-CLAT (Ratio)		
		CD86 and CD54	CD86	CD54
101 Cys reactive chemicals (> 13.89% depletion in only Cys pep)	86 (85.1%)	87 (86.1%)	69 (68.3%)	73 (72.3%)
51 Lys reactive chemicals (> 12.76% depletion in only Lys pep)	42 (82.4%)	46 (90.2%)	38 (74.5%)	39 (76.4%)

Table 1-1-5

リジンペプチドと特に高い反応性（減少率 >12.76%）を示す一方でシステインペプチドとは反応しない（減少率 <13.89%）感作性物質

Chemical	LLNA EC3(%)	Human data ^a	DPRA		KeratinoSens™	h-CLAT
			Lys(%)	Cys(%)		
3,4-Dihydrocoumarin	5.6	P	39.7	0.0	N	P
Eugenol	12.9	P	19.2	9.2	P	P
Pentachlorophenol	20	P	14.5	0.0	N	P
Cinnamic alcohol	21	P	15.1	0.0	P	P
Phthalic anhydride	0.16	N	75.0	1.9	N	N
α-methyl-trans-cinnamaldehyde	4.5	ND	28.8	10.4	P	P
Trimellitic anhydride	9.2	ND	43.7	0.0	N	P

第3節 考察

本章では、皮膚感作性のハザード予測において、被験物質を非感作性物質であることを明確化するボトムアップアプローチの1つとして、KeratinoSens™とh-CLATの組み合わせについて検討した。このアプローチでは、KeratinoSens™とh-CLATのうちいずれかで陽性が得られた場合に感作性物質と判断し、ともに陰性であった場合に非感作性物質と判断した。203物質のデータセット（感作性物質151物質、非感作性物質52物質）において、LLNAに対する予測性を検証したところ、LLNAで陽性となった物質に対してKeratinoSens™とh-CLATの組み合わせは93.4%の感度を示した。また、203物質のうち、LLNAとヒトデータが入手可能であった97物質（感作性物質72物質、非感作性物質25物質）において、ヒトデータに対する予測性を検証したところ、KeratinoSens™とh-CLATの組み合わせは94.4%の感度を示した。このことから、KeratinoSens™とh-CLATの組み合わせはLLNA（91.7%）と比べて、ヒトデータに対して高い予測性を示すことが明らかになった。2 out of 3 ITSは感度78.8%（vs. LLNA）および88.9%（vs. ヒトデータ）を示し、これは感度82.1%（vs. LLNA）および88.9%（vs. ヒトデータ）を示したh-CLAT単独とほぼ同等であった。一方で、3 out of 3 ITSは96.7%（vs. LLNA）および100%（vs. ヒトデータ）を示した。

以上より、3 out of 3 ITSは皮膚感作性のハザード予測において被験物質を非感作性物質であることを明確化するボトムアップアプローチとして、偽陰性の数を最小化するために最も優れたアプローチであることが示唆された。3 out of 3 ITSは、今回検討した中で最も高い感度を示し、93.4%（vs. LLNA）および94.4%（vs. ヒトデータ）であった。なお、注目すべきは、DPRAを除いたKeratinoSens™とh-CLATの組み合わせについてもほぼ同等の高い感度（96.7%（vs. LLNA）および100%（vs. ヒトデータ））を示したことであった。一方で3 out of 3 ITSは、特異度については、今回検討した中で最も低く、28.8%（vs. LLNA）および36%（vs. ヒトデータ）であった。

KeratinoSens™とh-CLATの組み合わせは、皮膚感作性のAOPのうちキーイベント②角化細胞の活性化およびキーイベント③樹状細胞の活性化を考慮し、有用性検証された。すなわち、規制上承認されたこの2つの試験によって構成されたアプローチを構築することができた。本章における解析から、DPRAにおけるシステイン反応性およびリジン反応性はKeratinoSens™とh-CLATの陽性判定に密接に関連していることが明らかになった。また、h-CLATはDPRAにおいてリジンペプチドと反応性が高い感作性物質に高い感度を示した。このことから、化学物質の求電子性はKeratinoSens™のARE活性化（キーイベント②）だけでなくh-CLATの樹状細胞活性化（キーイベント③）に対しても重要な誘因であり、キーイベント②や③は分子の初期減少（キーイベント①）に依存していることが示唆された。したがって、KeratinoSens™とh-CLATから得られる結果はDPRAから得られる情報を強く反映したものである可能性がある。以上より、

KeratinoSens™と h-CLAT の組み合わせによって、非感作性物質であることを担保するために必要な情報は十分に得られると示唆された。すなわち、KeratinoSens™と h-CLAT の組み合わせによって、3 out of 3 ITS と比べてより単純に AOP の初期の 3 つのキーイベントを反映した評価を行うことができた。

KeratinoSens™と h-CLAT の組み合わせにおける、偽陰性物質の解析によってこのアプローチの予測性限界が明らかになった。LLNA およびヒトデータと比べて、11 物質が偽陰性となった (Table 1-1-3)。Clotrimazole、1-cyclohexylethyl 2-butenate、N,N-dibutylaniline、および 1-octen-3-yl acetate は LLNA で陽性であったが、ヒトデータは入手できなかった。この 4 物質は LogKow >3.5 であり、DPRA、KeratinoSens™および h-CLAT の 3 試験いずれでも陽性と検出できなかった。h-CLAT においては LogKow >3.5 の物質が、KeratinoSens™においては LogKow >5 の物質が、細胞培養系への被験物質の低い溶解性によって偽陰性となる傾向があることが知られている^{32, 34)}。このことから、この 4 物質はその低い溶解性によっていずれの試験でも過小評価されたと示唆された。にもかかわらず、3 out of 3 ITS ではデータセット中の LogKow >3.5 の感作性物質 39 物質のうち 35 物質において正しく評価できており、89.7%の感度を実現したことは特筆すべきであった。すなわち、KeratinoSens™と h-CLAT の組み合わせにおいて全ての難水溶性物質が偽陰性となるわけではないものの、溶解性の低い物質の評価に向けてさらなる改良が必要であった。この問題を解決するため、最近動物を用いない試験法である EpiSensA が開発されている³⁷⁾。EpiSensA は市販の再構築ヒト皮膚培養モデルを用いた試験法であり、LogKow >3.5 の感作性物質 27 物質に対して 93%という高感度を実現した。EpiSensA に加えて、TIMES-SS のような *in silico* 技術からも追加的な情報が得られる。さらに、既存あるいは新規データから、化学構造上あるいはメカニズム上類似の化学物質について read-across アプローチから判断することも可能であろう¹⁹⁾。

11 の偽陰性物質のうち、clotrimazole および diethylenetriamine については pro-hapten と推定されている。Pro-hapten は皮膚感作性物質となる際に酵素による活性化を要する化学物質であり、pre-hapten は感作性物質となる際に自動酸化など非生物学的に活性化を要する化学物質である。DPRA は原理上代謝活性を持たない試験法であるにもかかわらず、diethylenetriamine は DPRA、KeratinoSens™および h-CLAT の 3 試験のうち DPRA でのみ陽性と判定されており、一般に pro-hapten と考えられている物質でも実際には DPRA で正しく検出され得る pre-hapten でもある可能性が示唆された。Pre-hapten も pro-hapten も共に活性経路を経た上で同じ感作性物質となり得ることが知られている³⁸⁾。本章で用いたデータセットには、TIMES-SS の予測で Pre-hapten とされたものが 10 物質、Pro-hapten とされたものが 16 物質、Pre-/pro-hapten とされたものが 19 物質含まれていた。評価した Pre-hapten またはかつ Pro-hapten のうち 2 物質について偽陰性物質としたことを考慮しても、ほとんどの Pre-/pro-hapten が KeratinoSens™と h-CLAT の組み合わせで正しく陽性と判定された。したがって、KeratinoSens™と h-CLAT の組み合わせで

得られた陰性結果は、被験物質を非感作性物質と判定するために有用であると示唆された。

Benzoyl peroxide、1,2-cyclohexane dicarboxylic anhydride、phthalic anhydride および squaric acid もまた、KeratinoSens™と h-CLAT の組み合わせで偽陰性であった。これについてはおそらくタンパク質との結合メカニズムに基づいて考察が可能であった。Benzoyl peroxide、1,2-cyclohexane dicarboxylic anhydride および phthalic anhydride は、主にアシル基をリジン残基に転移させるアシル転移誘導物質である^{39, 23, 40)}。Squaric acid は、タンパク質中のリジンと特異的に結合する性質を有している^{41, 23)}。したがって、もし被験物質がタンパク質との結合メカニズムからアシル転移誘導物質やアミン反応性であると示された場合には、KeratinoSens™と h-CLAT の組み合わせに加えて DPRA も実施した上で非感作性物質と判断する必要がある。

以上より、残る偽陰性物質は methyl pyruvate と kanamycin となった。Methyl pyruvate については、LLNA で陽性であった一方でヒトデータが入手できなかった。Methyl pyruvate は水溶媒環境下でカルボニル基が加水分解されることが知られている⁴²⁾。加水分解による生成物は TIMES-SS で陰性である。このため methyl pyruvate は *in vitro* の試験系において試験溶媒あるいは培養液中で加水分解され非感作性物質へ変化し、その加水分解前の感作性を DPRA、KeratinoSens™および h-CLAT の 3 試験で検出することが困難であった可能性がある。この点については今後さらなる解析が必要である。Kanamycin は LLNA で陰性であるが、ヒトでかなりの暴露を行った際に感作性物質となることが知られている²⁵⁾。加えて、kanamycin は他の感作性物質と構造上大きく異なりアミノグリコシド基を有しており、同様の構造を有する被験物質を評価する際には注意が必要であった。

KeratinoSens™と h-CLAT の組み合わせや 3 out of 3 ITS は、感作性物質を見逃すよりも過大評価する傾向があり、偽陽性物質が多くなる（特異度が低い）アプローチであった。偽陽性の原因は各々の試験法で異なる理由で生じた。KeratinoSens™においては、求電子性物質が作用することによる Keap1 の Nrf2 抑制機構の解除というメカニズム以外の機構（例：酸化ストレスや過酸化水素の細胞内生成）によって、非特異的な ARE 活性化が生じる可能性があり、偽陽性となることが報告されている²⁶⁾。h-CLAT においては、sodium lauryl sulfate のような非感作性の刺激性物質によって CD86 や CD54 の発現上昇が起きる場合があると報告されている⁴³⁾。HPLC を用いた試験法である DPRA においては、アダクト形成による合成ペプチドの減少が、酸化や二量体化によるペプチドの減少と区別できない^{44, 25)}。したがって、未知の反応機構によるペプチドの非特異的な酸化や二量体化が生じ、見かけ上合成ペプチドが減少した結果となり、アダクト形成していないにも関わらず判定上陽性となる可能性がある。このような酸化や二量体化が生じるという追加情報が得られる場合には、動物を用いない試験法で偽陽性となった原因を説明できるかもしれない。あるいは、現時点で報告は限られているものの、統計学や

機械学習を用いた予測モデルを活用した強度予測を行い、リスクアセスメントを実施する手段がある^{30, 45, 46)}。BN ITS は確率論的なアプローチによって感作強度を予測するモデルである³⁰⁾。このアプローチでは、1つの試験法で特異的に強い応答が認められる場合に、その他の試験法で陰性であっても重み付けをした上で評価を行う。したがって、これらアプローチでは得られたデータの一貫性を確認した上で、相反する結果について総合的に判断することが可能となる³⁰⁾。

以上をまとめたものを、Figure 1-1-1 に KeratinoSens™と h-CLAT の組み合わせや 3 out of 3 ITS を用いた評価フローとして示す。

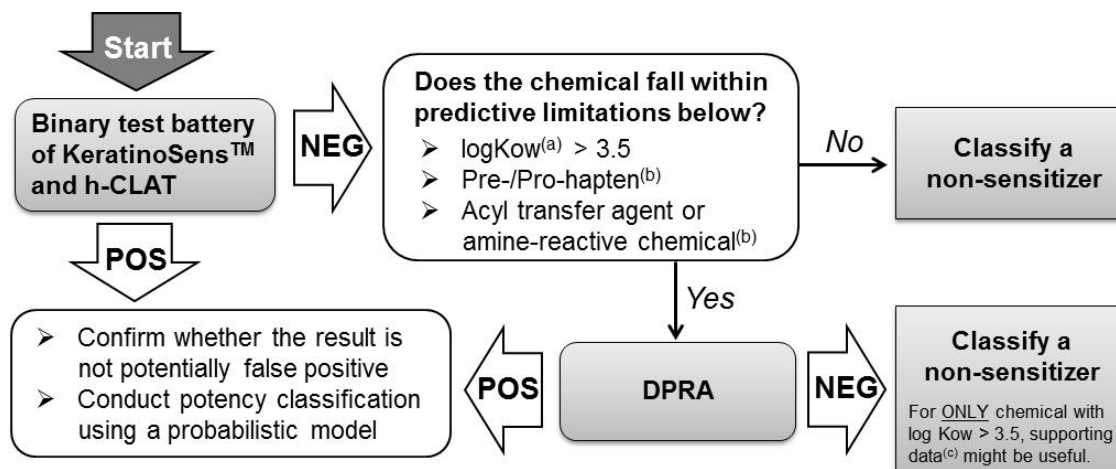


Figure 1-1-1

KeratinoSens™と h-CLAT の組み合わせや 3 out of 3 ITS を用いた評価フロー

第4節 小括

本章では、皮膚感作性のハザード予測において被験物質を非感作性物質であることを明確化するボトムアップアプローチの1つとして、KeratinoSens™とh-CLATの組み合わせについて検討した。203物質のデータセットにおいてLLNAに対する予測性を検証した結果、LLNAで陽性となった物質に対してKeratinoSens™とh-CLATの組み合わせは93.4%の感度を示した。また、ヒトデータが入手可能であった97物質において予測性を検証した結果、KeratinoSens™とh-CLATの組み合わせは94.4%の感度を示した。したがって、KeratinoSens™とh-CLATの組み合わせは皮膚感作性のハザード予測において3 out of 3 ITS とほぼ同等であり、被験物質を非感作性物質であることを明確化するボトムアップアプローチとして有用と判断された。LogKow >3.5の物質については、KeratinoSens™とh-CLATの組み合わせや3 out of 3 ITSの結果のみで非感作性物質と断定することはできず、KeratinoSens™とh-CLATの組み合わせと3 out of 3 ITSに共通した予測性限界と示唆された。一方で、pre-/pro-hapten やアシル転移誘導物質（またはアミン反応性物質）などの他の予測性限界については、KeratinoSens™とh-CLATの組み合わせに加えてDPRAも実施した上で非感作性物質と判断する必要がある。本アプローチは原則KeratinoSens™とh-CLATの2試験で被験物質を非感作性物質であることを明確化することができるため、3 out of 3 ITSと比べて、より単純にAOPの初期の3つのキーイベントを反映した評価を行うことができた。今後、KeratinoSens™とh-CLATの組み合わせはGlobally Harmonized System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals (UN GHS)のラベル分類、REACHや化粧品規制などの規制目的での利用も期待される。

第5節 Table 1-1-6 203物質のデータセット

Chemical	CAS No.	LogKow	LLNA Potency category	EC3 (%)	human		KeratinScaps ^{ns}		hCLAT Result ^a (μg/ml)	EC150 (μM)	EC150 Result ^a (μg/ml)	EC200 (μg/ml)	MIT (μg/ml)	CV75 (μg/ml)	DPRA ^a		Cys (%)	Lys average (%)	TIMES Result ^a	haptenation mechanism	Paraf ^d	Metabole ^e	MW
					EC3 (%)	EC3 (μM)	Result ^a	Result ^a							Result ^a	Result ^a							
Dibenzoylpropargylene	886-84	3.25	Extreme	0.003	P	0.5	178.5	490.4	1370.9	P	2.71	-	3.92	6.3	P	98.8	0.0	40.4	Strong	hapten	Strong	NS	206.24
Oxazolone	15646-46-5	1.51	3.66	0.004	P	4.32	7.63	17.48	P	0.21	-	0.21	166.6	0.2	P	75.5	49.6	62.6	Strong	hapten	Strong	NS	217.23
Chlorothalonil	20172-55-4	-0.83		0.005	P	2.0	No data	No data	P	2.21	-	2.21	3.2	P	90.9	4.3	47.6	Strong	hapten/pro-hapten	Strong	Strong	miscure	265.91
MCI/MI	& 2682-20-4	0.25		0.0099	P	6.5	32.8	104.5	P	2.67	2.24	2.24	4.3	P	99.0	91.0	95.0	Strong	hapten	Strong	NS	108.1	
1,4-Benzoxazine	106-51-4	5.87		0.04	P	1.2	2.1	11.1	P	-	2.98	2.98	6.3	P	36.8	90.0	22.9	Strong	hapten/pro-hapten	Strong	NS	351.02	
Tetrachloroacetylaniline	1154-59-2	0.74		0.04	P	0.5	2.0	12.1	P	3.8	1.6	1.6	4.9	P	87.5	4.2	45.9	Strong	hapten	Strong	NS	318.38	
Bianthracene	20048-27-5	2.27		0.05	P	2.5	3.9	8.2	P	1.92	2.23	1.92	5	P	100.0	14.7	57.3	Strong	hapten	Strong	NS	202.56	
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	2.27		0.05	P	1.3	2.1	9.1	P	0.8	0.9	0.8	3.8	P	100.0	24.2	62.1	Strong	hapten	Strong	NS	216.05	
4-Nitrophenyl bromide	100-11-8	2.7		0.08	P	1.3	2.0	4.3	P	2.09	1.06	1.06	3.2	P ^c	61.6	2.2	30.8	NOT PREDICTED ^d	NOT PREDICTED ^d	NOT PREDICTED ^d	NOT PREDICTED ^d	294.18	
Potassium dichromate	778-50-9	-3.59		0.1	P	24.3	69.4	242.6	P	2.78	2.7	2.70	5.3	P	30.2	85.4	57.8	Strong	hapten/pro-hapten	Strong	Strong	100.12	
Chloracetylene	111-30-8	1.03		0.11	P	9.8	51.3	130.7	P	2.13	-	2.13	5	P	83.3	51.1	67.2	Strong	pre-/pro-hapten	NS	Strong	110.1	
1,4-Dihydroquinone	123-31-9	1.03		0.16	P	5.0	46.7	438.9	P	2.09	-	2.09	36.7	P	93.0	23.5	58.3	Strong	pre-/pro-hapten	NS	Strong	108.14	
1,4-Phenylenediamine	106-50-3	-0.39		0.16	N	-	>2000	>2000	N	-	-	-	400	P	1.9	75.0	38.4	Strong	hapten	Strong	NS	148.17	
Phthalic anhydride	85-44-9	1.62		0.16	N	-	>2000	>2000	P	-	298.4	298.4	658.0	P	100.0	41.0	70.5	Strong	hapten	Strong	NS	98.0568	
Miscic anhydride	106-31-6	1.62		0.18	N	-	-	-	P	-	53.7	52.7	147.7	N	3.9	1.1	2.5	NS	-	NS	NS	222.29	
Hexyl salicylate	629-76-3	5.06		0.22	P	4.7	14.2	25.2	P	3.2	2.9	2.9	7.5	P	100.0	22.1	61.1	Strong	hapten	Strong	NS	171.04	
Benzoyl peroxide	100-39-0	2.88		0.22	P	1.1	-	507.6	N	-	-	-	41	P	100.0	81.3	90.7	Strong	hapten	Strong	NS	242.25	
4-Nitrophenol	94-36-0	3.43		0.3	P	1.1	8.8	20.2	P	2.02	2.91	2.02	8.2	P	90.9	37.7	49.8	Strong	pre-/pro-hapten	NS	Strong	123.14	
Lauryl gallate	106-52-5	0.21		0.3	P	12.8	20.7	67.9	P	1.1	32.4	32.4	125	P	96.3	20.6	31.2	Strong	pre-/pro-hapten	NS	Strong	333.2	
Propyl gallate	121-79-9	0.6		0.34	P	1.4	5.4	94.8	P	1.1	40.4	40.4	116	P	78.4	15.0	57.2	Strong	pre-/pro-hapten	NS	Strong	199.13	
2,5-Dimethyl-2-thiobarbitone	95-55-6	1.6		0.4	P	5.4	30.6	177.0	P	4.0	-	-	280	P	97.2	0.0	46.7	Strong	pre-/pro-hapten	NS	Strong	156.25	
Methyl 2-oxopropane sulfonate	615-50-9	0.16		0.45	P	2.5	15.7	87.6	P	28	-	-	375.8	P	97.2	0.0	48.6	Strong	hapten	Strong	NS	154.21	
N,N'-diphenyl-4-nitrosamine	111-12-6	2.6		0.48	P	11.5	786.4	>2000	P	3.6	3.2	3.2	9.0	P	100.0	0.0	50.0	Strong	hapten/pro-hapten	Weak	Strong	150.18	
2-Nitro-4-phenylacetamide	5307-14-2	0.55		0.5	P	11.5	786.4	>2000	P	-	276.7	276.7	490.7	P	93.3	0.0	46.7	Strong	pre-/pro-hapten	NS	Strong	153.14	
Cobalt chloride	7664-79-9	0.85		0.6	P	298.6	661.0	1330.2	P	-	35.5	35.5	208.3	P	100.0	100.0	100.0	NOT PREDICTED ^d	NOT PREDICTED ^d	NOT PREDICTED ^d	NOT PREDICTED ^d	129.84	
4-(N-Ethyl-N'-2-methanesulfonylaminoethyl)-phenyl-1,2,3-propanediamine	28646-71-3	-3.09		0.6	P	2.0	11.2	30.8	P	3.5	5.3	5.3	7.9	P	90.1	13.6	51.8	Strong	pre-/pro-hapten	NS	Strong	271.38	
4-(N-Ethyl-N'-2-methanesulfonylaminoethyl)-phenyl-1,2,3-propanediamine	127-65-1	-0.5		0.6	P	248.4	278.7	404.7	P	234.2	262.9	234.2	284.3	P	100.0	35.9	68.0	Strong	hapten/pro-hapten	Strong	Strong	227.64	
Formaldehyde	50-00-0	0.35		0.61	P	63.2	72.2	200.6	N ^b	4.3	5.2	4.3	5.8	P	60.4	11.2	35.8	Strong	hapten	Strong	NS	30.03	
1,2-cyclohexane dicarboxylic anhydride	85-42-7	2.17		0.84	N	-	>2000	>2000	N ^b	-	-	-	151.6	P	15.7	34.6	25.1	Strong	hapten	Strong	NS	154.17	
Isopropyl benzoic acid	55406-53-6	2.45		0.9	P	2.1	6.5	28.7	P	-	8.15	8.2	13.8	P	99.7	6.0	49.9	Weak	hapten	Weak	NS	281.09	
1,2-dibromo-2,4-dichlorobenzene	3601-65-7	1.63		0.9	P	7.8	18.1	25.6	P	10.8	9.42	9.4	9.9	P	100.0	28.6	64.3	Strong	pro-hapten	NS	Strong	265.04	
Sulfuric acid diethyl ester	5231-87-8	0.48		0.9	N	-	>2000	>2000	P ^b	38.7	56.5	38.7	69.1	N	2.4	1.6	2.0	Strong	hapten	Strong	NS	170.16	
3-Methylcyclohexanol	488-17-5	1.38	Moderate	1	P	15.8	18.7	50.9	P ^b	5.8	7.4	7.4	41.5	P	87.2	79.8	83.5	Strong	pre-/pro-hapten	NS	Strong	124.2	
5-Methyl-2-hepten-4-one	81925-81-7	2.22		1.06 ^a	P ^b	5.1	23.1	59.7	P ^b	5.8	9.4	5.8	14.4	P ^b	99.9	12.5	56.2	Weak	hapten	Weak	NS	126.196	
Isoeugenol	97-54-1	2.65		1.2	P	16.1	259.4	731.4	N	-	-	-	112.5	P	89.3	10.7	50.0	Strong	pre-/pro-hapten	NS	Strong	164.2	
1-Naphthol	90-15-3	2.69		1.3	P	129.6	-	541.0	P	18.3	12.7	12.7	57.2	P	21.8	17.4	19.6	Weak	pro-hapten	NS	Strong	144.173	
1-Phenyl-1,2-propanedione	579-07-7	1.11		1.4	P	32.3	238.9	759.0	P	81.5	56.7	56.7	123.1	P	47.1	15.4	31.3	Strong	hapten	Strong	NS	148.16	
2-Hydroxyethyl acrylate	818-01-1	-0.25		1.4	P	89.1	307.8	677.9	P	10.8	19.5	10.8	24.4	P	92.6	88.9	90.8	Positive	hapten	Positive ^d	NS	116.12	
Glyoxal	107-2-2	-1.66		1.4	P	89.1	307.8	677.9	P	-	286.7	286.7	396	P	56.5	67.8	62.2	Strong	hapten	Strong	NS	58.04	
4-Amino-n-cresol	2835-99-6	0.79		1.45	P	5.3	17.9	77.7	P ^b	18.0	11.5	11.5	19.2	P	90.0	28.8	59.4	Strong	pre-/pro-hapten	NS	Strong	123.2	
Bisphenol A-diglycidyl ether	1675-54-3	3.84		1.5	P	5.2	8.7	21.9	P	18.27	22.2	18.3	36	P	42.5	1.1	21.8	Strong	hapten	Strong	NS	340.4	
4-Vinyl pyridine	109-43-6	1.71		1.6	P	9.7	25.4	58.5	P ^b	3.8	5.7	3.8	11.4	P	92.1	0.0	46.0	Strong	hapten	Strong	NS	105.14	
2-Mercaptoethanol	149-30-4	2.86		1.7	P	48.1	340.1	1003.1	P	-	57.5	57.5	169	P	97.5	0.0	48.8	Strong	hapten/pro-hapten	Strong	Strong	167.25	
2-Methyl-2H-isothiazole	2682-20-4	-0.83		1.9	P	11.8	29.6	139.0	P	9.23	7.9	7.9	24.7	P	97.9	0.0	49.0	Strong	hapten/pro-hapten	Strong	Strong	115.15	
2,4-Dinitrochlorobenzene	885-02-1	-3.32		2	P	70.2	133.3	311.0	P ^b	82.1	549.5	371.8	1000.0	P	94.2	27.4	60.8	Strong	hapten	Strong	Strong	270.153	
3-Dimethylaminoethylamine	109-55-7	-0.45		2.2	P	85.8	472.4	1337.9	P	82.1	165.8	82.1	276.7	N	10.2	0.0	5.1	Strong	pro-hapten	NS	Strong	102.18	
Ethylene diamine	107-15-3	-1.62		2.2	P	99.9	453.4	>2000	P	265.7	-	265.7	271.7	N ^c	0.7	-0.3	0.4	Strong	pro-hapten	NS	Strong	60.1	

Compound	9005-65-6	4,2,3- serinifer	Non-	N	P	115.5	677.4	>2000	N	P	57.2	883.7	537.2	1000.0	N	2.3	1.9	2.1	5.1	10.2	-2.1	5.1	NS	NS	NS	1310	
Diethylphthalate	84-66-2	2.65	-	N	P	61.4	206.6	206.6	600	N	8.2	0.0	0.4	NS	NS	0.8	0.0	0.4	NS	NS	0.8	0.0	0.4	NS	NS	222.24	
Propylparaben	94-13-3	2.98	-	N	P	14.5	-	813.1	106.7	N	8.2	0.0	4.1	NS	NS	8.2	0.0	4.1	NS	NS	8.2	0.0	4.1	NS	NS	180.2	
Acetamide	100-06-1	1.75	-	N	P	377.6	1192.4	>2000	N	P	61.4	206.6	206.6	600	N	8.2	0.0	4.1	NS	NS	8.2	0.0	4.1	NS	NS	150.18	
Methylsalicylate	119-36-8	2.6	-	N	P	83.2	-	>2000	N	P	83.2	-	542.4	N	0.3	1.6	1.0	NS	NS	NS	0.3	1.6	1.0	NS	NS	152.15	
Vanillin	121-33-5	1.05	-	N	P	83.2	-	>2000	N	P	83.2	-	650	P ^c	1.1	45.1	23.1	Weak	NS	NS	1.1	45.1	23.1	Weak	NS	NS	152.15
Sulfonamide	63-74-1	-0.55	-	N	P	83.2	-	>2000	N	P	83.2	-	650	P ^c	1.1	45.1	23.1	Weak	NS	NS	1.1	45.1	23.1	Weak	NS	NS	172.21
1-Butanol	71-36-3	0.84	-	N	P	83.2	-	>2000	N	P	83.2	-	650	P ^c	1.1	45.1	23.1	Weak	NS	NS	1.1	45.1	23.1	Weak	NS	NS	74.12
Isopropanol	67-63-0	0.28	-	N	P	83.2	-	>2000	N	P	83.2	-	650	P ^c	1.1	45.1	23.1	Weak	NS	NS	1.1	45.1	23.1	Weak	NS	NS	60.1
Propylene glycol	57-55-6	-0.78	-	N	P	83.2	-	>2000	N	P	83.2	-	650	P ^c	1.1	45.1	23.1	Weak	NS	NS	1.1	45.1	23.1	Weak	NS	NS	76.1
Tartaric acid	87-69-4	-1	-	N	P	3.4	-	No data	N ^b	P	608.9	608.9	1456.0	N	3.8	1.2	2.5	NS	NS	NS	3.8	1.2	2.5	NS	NS	150.09	
Sulcylate acid	69-72-7	2.24	-	N	P	3.4	-	No data	N ^b	P	608.9	608.9	1456.0	N	3.8	1.2	2.5	NS	NS	NS	3.8	1.2	2.5	NS	NS	138.12	
4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7	1.39	-	N	P	3.4	-	>2000	N	P	3.4	-	608.9	N	10.0	2.2	1.1	NS	NS	NS	10.0	2.2	1.1	NS	NS	138.12	
Lactic acid	56-81-5	-1.65	-	N	P	3.4	-	>2000	N	P	3.4	-	608.9	N	10.0	2.2	1.1	NS	NS	NS	10.0	2.2	1.1	NS	NS	92.09	
Benzalchloium chloride	50-21-5	-0.65	-	N	P	3.4	-	>2000	N	P	3.4	-	608.9	N	10.0	2.2	1.1	NS	NS	NS	10.0	2.2	1.1	NS	NS	90.08	
Dibutylphthalate	84-74-2	2.93	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	319.58
Chlortene	637-07-0	3.62	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	278.35
3-Chloro-p-aminosalicylic acid	108-90-7	2.64	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	242.699
1-Bromobutane	109-65-9	2.44	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	170.93
2-Fluoro-5-nitroaniline	369-36-8	1.67	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	137.02
Benzene 1-methoxy-4-methyl-2-nitro	119-10-8	2.44	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	156.12
Ethylhexanoate	94-02-0	1.71	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	167.17
Fruil	92-48-8	1.8	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	192.21
6-Methyl-sunarin	3055-86-5	2.06	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	160.17
3-Prenoxypropionamide	121-32-4	1.55	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	147.174
Ethyl vanillin	124-12-9	2.8	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	166.18
Oxalacetate	75-35-4	2.12	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	125.211
Vanillic acid chloride	134-62-3	2.26	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	96.943
NN-Diethyl-m-tolamide	99-76-3	1.57	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	191.28
Methylparaben	112-07-2	1.21	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	152.15
Ethano-2-butyl- acetate	3395-91-3	1.34	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	160.211
Propionic acid 3-bromo- methyl ester	874-28-7	4.84	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	167
2-Acetyl-cyclohexanone	85-68-7	0.72	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	140.181
Butylbenzoylphthalate	923-26-2	0.45	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	312.37
2-Hydroxypropyl methacrylate	81-07-2	3.54	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	144.169
Succharin	112-06-0	1.47	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	183.184
Nonanoic acid	2345-34-8	3.03	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	180.157
4-Carboxyphenylacetate	124-07-2	-2.08	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	144.2
Oxanoic acid	121-57-3	1.87	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	173.2
Benzoic acid	68-85-0	-0.93	-	N	P	56.4	-	4.0	N	P	56.4	-	4.0	N	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	3	2.8	0.0	1.4	NS	NS	122.12
Dimethyl formamide	7733-02-0	1.69	False positive	N	P	182.6	419	387.3	P	-	62	62.0	670.8	N	6.88	0	3.425	NOT PREDICTED	NS	NS	6.88	0	3.425	NOT PREDICTED	NS	NS	73.1
Zinc sulfate	151-21-3	1.69	False positive	N	P	182.6	419	387.3	P	-	62	62.0	670.8	N	6.88	0	3.425	NOT PREDICTED	NS	NS	6.88	0	3.425	NOT PREDICTED	NS	NS	161.45
Sodium lauryl sulfate	151-21-3	1.69	False positive	N	P	182.6	419	387.3	P	-	62	62.0	670.8	N	6.88	0	3.425	NOT PREDICTED	NS	NS	6.88	0	3.425	NOT PREDICTED	NS	NS	288.4

^a P: positive; N: negative
^b Jaworska et al., 2015
^c Takemoto et al., 2015
^d "cys", percent of cysteine peptide depletion. "lys", percent of lysine peptide depletion. "average", a average depletion value. In case of co-depletion of the lysine peptide, if the peptide depletion of cysteine exceeded 13.89%, the result was classified as positive. Otherwise, classified as negative.
^e "resul", most potent result in potency predicted from parental and metabolic structure alerts.
^f "parent", predicted potency of parental structure.
^g "metabolic", predicted potency of metabolic structures.
^h Out of amphoteric domains, such as metal.
ⁱ Structure alert was given, but potency classification could not be done since model criteria were not met.

第2章 Bayesian network Integrated Testing Strategy (BN ITS-3) を用いたリスクアセスメント技術の構築と実践

皮膚感作性の動物実験代替法として、タンパク結合性に着目した DPRA^{4,5)}、角化細胞活性化に着目した KeratinoSens^{TM 6)}、および樹状細胞活性化に着目した h-CLAT⁷⁾が開発され、それぞれ OECD テストガイドラインとして収載された^{31,32,34)}。これら *in vitro* 試験は、AOP におけるキーイベントの 1 つしか反映できていない点や予測性の観点から単独では十分でないため、動物を用いない手法による強度予測については、これまで複数の *in vitro* 試験に加え物理化学的性状や *in silico* データも含めた情報を組み合わせる検討が、近年盛んに行われてきた⁹⁾。

Sequential testing strategy (STS) や Integrated testing strategy (ITS) は、単純に DPRA などの試験法で感作性物質を分類し、strong、weak、未分類 (not classifiable) を予測するアプローチである⁴⁷⁾。また、ここ数年で機械学習に基づくアプローチも活発に開発が進んでいる^{48,45,30)}。この中でも artificial Neural Network (ANN) は SH test、ARE assay および h-CLAT の結果を用いた手法である⁴⁵⁾。これらの試験法は、AOP におけるキーイベントを考慮したものではあるが、OECD テストガイドラインに収載された試験法ではなく、また ANN は各因子の重み付けのなされ方が明確ではないといった問題点がある。そこで Natsch らは、被験物質とペプチドの結合の速度論と KeratinoSensTM に基づく予測モデルを報告した⁴⁸⁾。このアプローチでは回帰分析が用いられ、予測モデルの構造が明確化された。しかし、この予測モデルでは、AOP におけるキーイベントのうち、③樹状細胞活性化に着目した評価がなされていないという問題点があった。

Bayesian Network Integrated Testing Strategy (BN ITS-3) は Procter & Gamble 社の Jaworska らによって開発され、市販ソフトである BayesiaLab 5.4 platform (Bayesia SAS, Laval, Cedex, France) に、物理化学的性質に基づく生物学的利用能 (水への溶解性、解離による分子の脂溶性の変化を考慮に入れた LogKow (オクタノール/水分配係数) の予測値である Log D、水溶液中イオン化率および血漿タンパク結合性)、化学構造に基づく *in silico* 予測、DPRA、KeratinoSensTM、および h-CLAT の 3 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を入力することで実行することが可能なシステムである³⁰⁾。その上で、本方法は、LLNA における 4 つの感作強度分類に対する確率分布に基づいて、非感作性物質、weak、strong および extreme の 4 つに感作強度を予測する。

そこで本章では、BN ITS-3 を用いた感作強度予測と予測された感作強度に基づく定量的リスクアセスメントの実現を目的に検討を行った。

第1節 実験

1. BN ITS-3

BN ITS-3 は、市販ソフトである BayesiaLab 5.4 platform (Bayesia SAS, Laval, Cedex, France) に Jaworska らが提供する以下の因子を入力することで感作性評価を実行するシステムで、次のデータを用いて予測を行う。

1. 物理化学的性質に基づき、ACD Labs Percepta (ACD Labs, Toronto, Canada) を用いて pH=7 の際の生物学的利用能 (水への溶解性、Log D、水溶液中イオン化率および血漿タンパク結合性) の定量値を算出。
2. TIMES-SS (第1編 第1章 第1節) を用いた皮膚感作性の *in silico* 予測。
3. DPRA、KeratinoSensTM、および h-CLAT の3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 (第1編 第1章 第1節)。

BN ITS-3 は DPRA、KeratinoSensTM、および h-CLAT の情報について、被験物質の水への溶解性と水溶液中イオン化率に基づいてデータの採用制限を設けた。pH=7 で完全にイオン化した化学物質は、生物学的利用能の観点から細胞培養系の試験に適さない。Jaworska ら (2015) は、pH=7 における水溶液中イオン化率が 99.997% の squaric acid と 99.998% の tartaric acid が、完全にイオン化した化学物質として取り扱われた。したがって、これらの化学物質については、検証用セットに用いたデータセットでは KeratinoSensTM と h-CLAT の結果は除外された。一方で、被験物質の水への溶解性と水溶液中イオン化率に基づくデータの採用制限は検証用セットでは用いられたものの訓練用セットでは用いられなかった³⁰⁾。したがって本章では、被験物質の水への溶解性と水溶液中イオン化率に基づくデータの採用制限は設定しなかった。BN ITS-3 は LLNA における 4 つの感作強度分類に対する確率分布に基づいて、感作強度予測を行った。LLNA の EC3 値は陽性判定基準値に達する暴露濃度であり、w/v% で表される値であるが、Jaworska らはモル単位で表した³⁰⁾。この変換によって、EC3 が 90% に近い物質や MW が小さい物質については、過小評価が生じる場合があった。たとえば、w/v% に基づく分類では weak や moderate に分類された物質が、モル単位に基づく分類では非感作性物質や moderate に分類される場合があった。したがって、本章では LLNA の強度分類を w/v% に基づいて表した。また、Jaworska ら (2015) はマイケル付加反応を生じる物質については BN ITS-3 に基づく予測は修正されたが、この修正は検証用セットのみに対して行われ、この修正が適用された物質は元よりも弱い強度へ分類された。したがって本章では、十分な検証に基づかない過小評価を防ぐため、マイケル付加反応を生じる物質に対する修正は行わなかった。BN ITS-3 では算出された確率分布はベイズ因子 (B) へと変換したうえで、非感作性物質については B > 3 (十分な証拠の重み) である場合にのみ予測結果を採用し、感作性物質については B > 1 である場合にのみ予測結果

を採用した。最も高い B について算出された分類に基づいて強度予測を行った³⁰⁾。

2. 175 物質のデータセット

第1編 第1章 第1節で用いた203物質のデータセットに基づいて構築した。Potassium dichromate や sodium lauryl sulfate などの7物質の金属塩と、混合物である methylchloroisothiazoline/methyl isothiazoline (MCI/MI) は、BN ITS-3 の検証用セットにも訓練用セットにも用いないためにデータセットから除外した。さらに、bisphenol A glycerolate dimethacrylate (bis-GMA) は DPRA におけるリジンペプチドのデータが欠損していたために除外した。Methyl pyruvate、clotrimazole、1-cyclohexylethyl 2-butenolate、1-octen-3-yl acetate、methyl salicylate、sulfanilamide、1-butanol、isopropanol、propylene glycol、4-hydroxybenzoic acid、glycerol、lactic acid、octanenitrile、vinylidene dichloride、N,N-diethyl-m-toluamide、sulphanilic acid、dimethyl formamide および saccharin については、DPRA、KeratinoSensTM、および h-CLAT の3試験いずれにおいても陰性であったため、BN ITS-3 を用いた強度予測を行う必要がないと判断し、本章では解析対象から除外した。その上で、第5節に示した残る175物質（非感作性物質：34物質、weak：55物質、moderate：56物質、strong および extreme：30物質）について、BN ITS-3 を用いて感作強度予測の解析を行った。

3. 動物を用いない試験法

3-1. KeratinoSensTM

第1編 第1章 第1節にプロトコルについて記載した。

3-2. Human cell line activation test (h-CLAT)

第1編 第1章 第1節にプロトコルについて記載した。

3-3. KOWWIN ver.4.1 in EPI suiteTM

第1編 第1章 第1節に記載した。

3-4. Tissue metabolism stimulator for predicting skin sensitization (TIMES-SS) ver.2.27.17

第1編 第1章 第1節に記載した。

3-5. ACD/Percepta による物理化学的性質の算出

物理化学的性質（水への溶解性、Log D、LogKow、水溶液中イオン化率、血漿タンパ

ク結合性)を算出する際に ACD/Percepta を用いた。ここで、水溶液中イオン化率は次の関係式から算出した。

$$\text{水溶液中イオン化率} = |1 - 10^{\text{LogD}} / 10^{\text{LogKow}}|$$

(| | : 絶対値)

3-6. 統計解析

第1編 第1章 第1節に記載した。

3-7. 香料原料を用いた定量的リスクアセスメントのケーススタディ

本章では、BN ITS-3 を用いた定量的リスクアセスメントのケーススタディとして、国際化粧品香料協会の安全性プログラム実施規則第 48 修正における国際化粧品香料協会基準の収載されている香料原料のリスクアセスメントを検討した。

香料原料の定量的リスクアセスメントは、評価物質の感作強度と暴露量の2つの因子に基づいて、次の3つのステップに基づいて行った¹⁰⁾。まず、評価物質の感作性強度を、NESIL を指標として決定した。NESIL は、通常単位面積当たりの暴露量として表し、LLNA EC3、human repeated insult patch test (HRIPT) や human maximization test (HMT) のようなヒト試験における no observed effect levels (NOEL) を基に設定された。次に個人差、溶媒影響、使用状況を反映するため、感作アセスメント係数 (sensitization assessment factor, SAF)^{12, 13)}の適用を行うことで、ヒトで感作を誘導しないと考えられる許容暴露量 (acceptable exposure level, AEL) を次の関係式に基づいて算出した。

$$\text{AEL} = \text{NESIL} / \text{SAF}$$

ここで、AEL は消費者が感作の誘導を防ぐことのできる暴露量として推算し、 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{day}$ という単位で表した。

最後に消費者暴露量 (consumer exposure level, CEL) の算出を行った。ここで、CEL は Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) から報告されている値を用いた¹⁴⁾。以上の過程をふまえ、 $\text{AEL} > \text{CEL}$ となれば、皮膚感作性のリスクは小さいとアセスメントした。

第2節 結果

1. BN ITS-3 による感作強度予測性

第1節に示した基準に従って BN ITS-3 の LLNA に対するハザード検出の予測性を検証すると、感度は 94.3% (133/141)、特異度は 85.3% (29/34)、一致率は 92.6% (162/175) であった (Table 1-2-1)。これらの結果から、BN ITS-3 が高い予測性で化学物質のハザード検出が可能であると結論付けた。Table 1-2-1 に、LLNA の 4 つの強度分類 (非感作性物質 (non-sensitizer; NS)、weak、moderate、strong/extreme) おける BN ITS-3 の予測性についても示す。4 つの強度分類の全体の予測性は 66.3% (116/175) であった。また、strong/extreme、moderate、weak の予測性はそれぞれ 73.3% (22/30)、48.2% (27/56)、69.1% (38/55) であった。20.6% (29/141) の物質については、感作強度を過小評価し、17.1% (30/175) の物質については感作強度を過大評価することが明らかになった。一方で、175 物質のうち 163 物質については、予測結果は感作強度 1 分類の違いの範囲であった。また、感作強度 2 分類の過小評価が生じた物質は 4 物質であり、hexyl salicylate および benzoyl peroxide は LLNA で strong の物質を BN ITS-3 で weak と過小評価し、diethylenetriamine および squaric acid は LLNA で moderate の物質を BN ITS-3 で非感作性物質と過小評価した。

Table 1-2-1

175 物質における BN ITS-3 による感作強度予測性

LLNA の 4 つの強度分類（非感作性物質（non-sensitizer; NS）、weak、moderate、strong/extreme）における BN ITS-3 の予測性を示した。

LLNA category	Number	BN ITS-3			
	175	strong	moderate	weak	NS
extreme-strong	30	22	6	2	0
moderate	56	14	27	13	2
weak	55	5	6	38	6
NS	34	1	2	2	29

2. BN ITS-3 で過小評価した物質

Table 1-2-2 に、LLNA に対して BN ITS-3 で過小評価された 29 物質を示す。29 物質のうち、phthalic anhydride, maleic anhydride および 1,2-cyclohexane dicarboxylic anhydride はアシル転移誘導物質と考えられ (本編 第 1 章)、LLNA で strong の物質を BN ITS-3 で moderate と予測した。Benzoyl peroxide はアミン反応性物質であり (本編 第 1 章)、LLNA で strong の物質を BN ITS-3 で weak と、感作強度を 2 分類過小評価する予測を示した。Squaric acid diethyl ester および squaric acid もアミン反応性物質であり、LLNA でそれぞれ strong と moderate の物質を BN ITS-3 で moderate と非感作性物質と予測した。Undec-10-enal, *p*-isobutyl- α -methyl hydrocinnamaldehyde, hexyl salicylate および farnesol は、LogKow >3.5 の難水溶性の物質であり、BN ITS-3 で weak と過小評価された。2-Nitro-4-phenylenediamine, dihydroeugenol、dibenzyl ether、4-chloroaniline および diethylenetriamine については pre-/pro-hapten であった。2 分類の過小評価が生じた 4 物質 benzoyl peroxide、squaric acid、hexyl salicylate および diethylenetriamine はアシル転移誘導物質、アミン反応性物質、LogKow >3.5 の難水溶性の物質、pre-/pro-hapten のいずれかに該当し、これら予測性限界となりうる物質を除外すれば、全ての物質の予測結果は過小評価するとしても 1 分類の違いの範囲であった。

Table 1-2-3 に、Table 1-2-1 に示したデータセットからアシル転移誘導物質、アミン反応性物質、LogKow >3.5 の難水溶性の物質および pre-/pro-hapten に該当する 81 物質を除いた 94 物質の BN ITS-3 の予測結果を示す。これら 94 物質において、4 つの強度分類の全体の予測性は 71.2% (67/94) であった。Strong/extreme、moderate、weak および非感作性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) であった。一方、20.6% (14/68) の感作性物質については過小評価となり、13.8% (13/94) の物質については過大評価となった。

Table 1-2-2

LLNA に対して BN ITS-3 で過小評価された 29 物質

Chemical name	LLNA		BN ITS-3		Discussion
	EC3 (%)	Potency category	Potency category	Potency category	
Phthalic anhydride	0.16	strong	moderate	Acyl transfer agent, amine reactive chemical (Natsch et al., 2015)	
Maleic anhydride	0.16	strong	moderate	Acyl transfer agent, amine reactive chemical (Natsch et al., 2015)	
1,2-cyclohexane dicarboxylic anhydride	0.84	strong	moderate	Acyl transfer agent, amine reactive chemical (Natsch et al., 2015)	
Benzoyl peroxide	0.22	strong	weak	Acyl transfer agent, amine reactive chemical (Riroid et al., 2015; Natsch et al., 2015)	
Squaric acid diethyl ester	0.9	strong	moderate	Amine reactive chemical (Natsch et al., 2013)	
Squaric acid	4.3	moderate	NS	Amine reactive chemical (Natsch et al., 2013)	
Undec-10-enal	6.8	moderate	weak	LogKow=4.12	
p-Isobutyl- α -methyl hydrocinnamaldehyde	9	moderate	weak	LogKow=4.4	
Hexyl salicylate	0.18	strong	weak	LogKow=5.06	
Farnesol	4.1	moderate	weak	LogKow=5.77, Pre-hapten	
2-Nitro-4-phenylenediamine	0.5	strong	moderate	pre/pro-hapten	
Dihydroeugenol	6.8	moderate	weak	pre/pro-hapten	
Dibenzyl ether	6.3	moderate	weak	pre-hapten	
4-chloroaniline	6.5	moderate	weak	pro-hapten	
Diethylenetriamine	5.8	moderate	NS	pro-hapten	
Formaldehyde	0.61	strong	moderate		
1-Phenyl-1,2-propanedione	1.3	moderate	weak		
Allyl phenoxyacetate	3.1	moderate	weak		
6-Methyl-3,5-heptadien-2-one	5	moderate	weak		
trans-2-Hexenal	5.5	moderate	weak		
Perillaaldehyde	8.1	moderate	weak		
Methyl methanesulphonate	8.1	moderate	weak		
3-Methyl-1-phenylpyrazolone	8.5	moderate	weak		
Oxalic acid anhydrous	15	weak	NS		
Benzocaine	22	weak	NS		
Pyridine	72	weak	NS		
Diethyl acetaldehyde	76	weak	NS		
Aniline	89	weak	NS		
Methylmethacrylate	90	weak	NS		

Table 1-2-3

アシル転移誘導物質、アミン反応性物質、難水溶性の物質および pre-/pro-hapten に該当する物質を除いた 94 物質における BN ITS-3 による感作強度予測性

LLNA category	Number		BN ITS-3		
	94	strong	moderate	weak	NS
extreme-strong	13	12	1	0	0
moderate	30	7	16	7	0
weak	25	2	3	14	6
NS	26	0	0	1	25
Potency	Accuracy			71.2%	((12+16+14+25)/94)
	Accuracy for S			92.3%	(12/13)
	Accuracy for M			53.3%	(16/30)
	Accuracy for W			56.0%	(14/25)
	Under-predictive rate			20.6%	((1+7+6)/68)
	Over-predictive rate			13.8%	((7+2+3+1)/94)

3. 新規感作強度予測分類の定義を用いたリスクアセスメントフロー

BN ITS-3 における 1 分類の過小評価の懸念（過小評価率 20.6% (14/68)）を最小化するために、本章では BN ITS-3 から得られる最少の EC3 を NESIL として設定した新規感作強度予測分類を構築した (Figure 1-2-1)。この際、BN ITS-3 で weak、moderate と判定された場合には、それぞれ EC3 が 10%、1%であると想定して定量的リスクアセスメントを実施することとした。また、BN ITS-3 で strong と判定された場合には、EC3 は設定しなかった。さらに、もし BN ITS-3 で非感作性物質と判定された場合でも、1 分類の過小評価の懸念を考慮し、EC3 が 100%であると想定して定量的リスクアセスメントを実施し、暴露量に制限を設けることとした。

以上をふまえ、前章 第 3 節 Figure 1-1-1 に加え、BN ITS-3 と新規感作強度予測分類に基づくリスクアセスメントを組み合わせ、Figure 1-2-2 に示す総合的なフローを構築した。

BN ITS-3 Decision		Conservative default EC3
NS	⇒	EC3 = 100%
Weak	⇒	EC3 = 10%
Moderate	⇒	EC3 = 1%
Strong	⇒	Not defined

Figure 1-2-1

新規感作強度予測分類

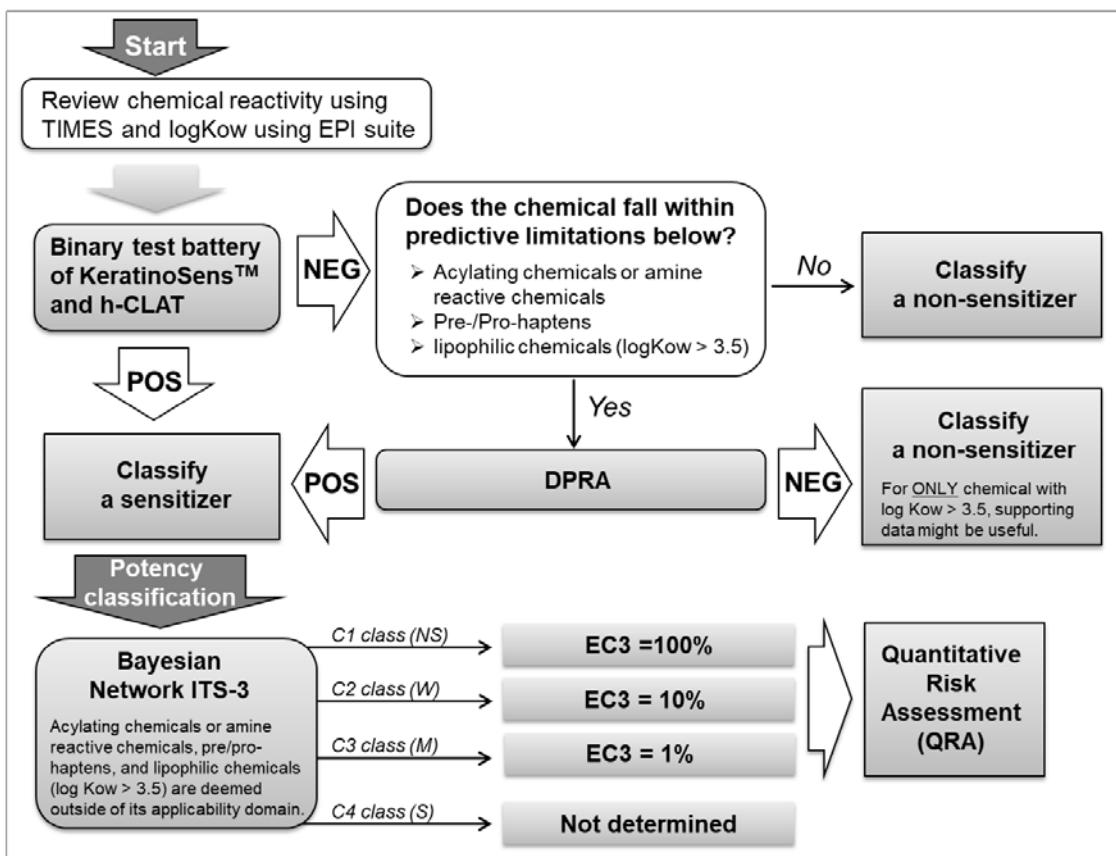


Figure 1-2-2

BN ITS-3 と新規感作強度予測分類に基づくリスクアセスメントフロー

4. 香料原料を用いたケーススタディ

ケーススタディとして、香料原料として知られる Table 1-2-4 に示した 10 物質について、BN ITS-3 による強度予測と、その結果を新規感作強度予測分類に基づくリスクアセスメントフローに適用した際の許容暴露量を算出した。これら 10 物質はいずれも、アシル転移誘導物質（アミン反応性物質）、難水溶性の物質および pre-/pro-hapten には該当しなかった。この表から明らかなように、半数の物質（検証した 10 物質中 5 物質）では LLNA 由来の NESIL とヒト試験由来の NESIL の間で、1 桁以上の違いが認められた。一方で、BN ITS-3 の新規感作強度予測分類に基づく NESIL とヒト試験由来の NESIL を比べると、多くの物質（検証した 10 物質中 8 物質）で差が 1 桁以内の値となった。

Table 1-2-4

香料原料を用いたケーススタディ

	LLNA weighted mean EC3 values; LLNA NESIL ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Human NOEL; Human NESIL ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	BN ITS-3 prediction (Lowest EC3)	NESIL ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) from BN ITS-3 prediction
Methyl heptine carbonate	<125	118	strong (not defined)	Not defined
3-Propylidenephthalide	350	945	moderate (1%)	250
Safranal	<250	29.5	moderate (1%)	250
2-Phenylpropionaldehyde	1575	388	moderate (1%)	250
Cyclamen aldehyde	5413	5905	weak (10%)	2500
α -Amyl cinnamic aldehyde	2942	23622	weak (10%)	2500
Carvone	2675	2657	weak (10%)	2500
Perillaaldehyde	2175	709	weak (10%)	2500
Benzyl alcohol	>12500	5906	NS (100%)	25000
Coumarin	>12500	3543	NS (100%)	25000

第3節 考察

本章では、BN ITS-3 を用いた感作強度予測と予測された感作強度に基づく定量的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 の感作強度予測性を本編 第1章で用いた 203 物質のデータセットに対して検証した。その結果、感作強度 2 分類と大きく過小評価される物質が予測性限界とされ得る性質（アシル転移誘導物質、アミン反応性物質、LogKow >3.5 の難水溶性の物質、pre-/pro-hapten）を有していることを明らかにした。これら予測性限界となりうる 81 物質を除外した上で予測性を検証したところ、予測結果は過小評価するとしても 1 分類の違いの範囲であった。さらに、BN ITS-3 による過小評価の懸念を最小化するために、本章では予測結果が過小評価される程度を考慮し、新たに 4 つの感作強度分類を定義した。

LLNA の EC3 値は陽性判定基準値に達する暴露濃度であり、w/v% で表される値であるが、Jaworska ら（2015）では全ての値をモル単位で表している。この変換によって、EC3 が 90% に近い物質や分子量が小さい物質については、過小評価される場合があった。したがって、本章では LLNA の強度分類を w/v% に基づいて表した。

偽陰性物質の解析においては、このアプローチの予測性限界が次のように明らかになった。2 分類の過小評価が生じた 4 物質（benzoyl peroxide、squaric acid、hexyl salicylate および diethylenetriamine）はアシル転移誘導物質、アミン反応性物質、LogKow >3.5 の難水溶性の物質、pre-/pro-hapten のいずれかに該当し、これら予測性限界となりうる物質を除外すれば、全ての物質の予測結果は過小評価するとしても 1 分類の違いの範囲であった。データセットからアシル転移誘導物質、アミン反応性物質、LogKow >3.5 の難水溶性の物質および Pre-/pro-hapten に該当する 81 物質を除いた 94 物質の BN ITS-3 の予測結果を示した。これら 94 物質において、4 つの強度分類の全体の予測性は 71.2% (67/94) であった。Strong/extreme、moderate、weak および非感作性物質の予測性は、それぞれ 92.3% (12/13)、53.3% (16/30)、56.6% (14/25) および 96.2% (25/26) であった。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り、過小評価の差が小さくなることが明らかになった。

ケーススタディとして、感作性を有することが知られており、BN ITS-3 の適用範囲である香料原料 10 物質について、BN ITS-3 による強度予測と、その結果を新規感作強度予測分類に基づくリスクアセスメントフローに適用した際の許容暴露量を算出した。その結果、BN ITS-3 は LLNA と同程度の予測性でヒト NESIL を予測することができることが示唆された。しかし、BN ITS-3 と LLNA 両方において、ヒト試験由来の NESIL に対して感作強度を過小評価してしまう物質も一部存在した。この点については、強い有害事象を意図的には生じさせないように実施されるヒト試験において、比較的 low 濃度で感作性物質が暴露され最大無影響濃度を NESIL として設定されたため、実際の無影響量より低く見積もられていることが影響している可能性がある。一方で、動物実験で

ある LLNA 由来の NESIL は、有害事象が認められる濃度を想定して予測された値であった。この違いによって、一部の感作性物質でヒト試験由来の NESIL が NESIL あるいは LLNA 由来の NESIL よりも小さな値となった可能性があると考えた。

第4節 小括

本章では、BN ITS-3 を用いた感作強度予測と予測された感作強度に基づいて定量的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 の感作強度予測性を本編第1章で用いた203物質のデータセットを用いて検証し、大きく（2分類）過小評価された物質が、予測性限界となる性質を有していることを明らかにした。これら予測性限界となりうる物質は、アシル転移誘導物質、アミン反応性物質、 $\text{LogKow} > 3.5$ の難水溶性の物質および pre-/pro-hapten に該当する81物質であり、これらの物質はBN ITS-3 でも正しく評価することが困難であることが示唆された。そこで、これらを除いた94物質のBN ITS-3 の予測結果を Table 1-2-3 に示した。これら94物質において、4つの強度分類の全体の予測性は71.2% (67/94) であった。Strong/Extreme、moderate、weak および非感作性物質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) であった。68品の感作性物質については14品(20.6%)で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。その上で、BN ITS-3 による過小評価の懸念を最小化するために、本章では予測結果が過小評価される程度を考慮し、新たに4つの感作強度分類を Figure 1-2-1 のように定義した。この際、各強度分類における最小の EC3 を想定されるワーストケースのリスクとして考慮した。本章で提案した評価フローに基づけば大きなリスクなく運用可能であることが示唆された。

第2編 植物エキスの皮膚感作性に対する動物を用いない評価技術の適用性検証と実践

第1章 植物エキス中の感作性物質の検出能力検証

化粧品には、水、ethanol や 1,3-butylene glycol などの溶媒で植物の成分を抽出した植物エキスなど、天然由来の複雑な混合物が数多く配合されている。また、いくつかの植物エキス中には皮膚感作性を有する物質が存在し、それらが接触皮膚炎を引き起こす恐れがあることが報告されている^{20, 21)}。植物エキスに対する動物を用いない感作性評価としては、機器分析を用いたアセスメント手法が提案されてきた⁴⁹⁾。植物エキスは大部分が皮膚感作性のない溶媒である一方、抽出成分中に含まれる物質による皮膚感作性の評価およびリスクアセスメントが重要である⁵⁰⁾。しかし、感作性物質には様々な反応機構があり^{39, 18)}、感作性を誘導すると考えられる化学構造も多岐に渡るため、複雑な混合物である植物エキス中の感作性物質を Non-target の網羅分析から定性・定量することは多くの時間を要し、困難である。そこで今回、植物エキスの皮膚感作性評価のために、代替法を用いることができないか検討した。しかし、代替法を用いた既報の評価体系は、高純度・単一物質しか適用できない試験も含まれており、植物エキスへの適用は難しい。例として、*in silico* 技術は評価物質の構造に基づいて評価を行うため、化学構造不明な成分を含む植物エキスを評価することはできない。また *in vitro* 試験の中でも、DPRa についてはモデルペプチドと評価物質を特定のモル比で混合させるため、化学構造情報が必要であり植物エキスを評価することは困難である。したがって、植物エキスの評価に向けては、化学構造の情報がなくとも評価に適用させることのできる *in vitro* 試験による評価が必要である。

化学構造の情報がなくとも評価に適用させることのできる *in vitro* 試験を用いた植物エキス中の感作性物質の評価については、これまでに KeratinoSens™を用いた研究が報告されている⁵¹⁾。Andres らは、KeratinoSens™が植物エキス中に存在する感作源を検出可能か検証する pilot study を行った。KeratinoSens™で陰性の植物エキスに対し感作性物質をさまざまな濃度で添加し、その感作性を検出できるか評価した。その結果、植物エキス中に 2%か、それ以上含有させた moderate あるいは weak の感作性物質 (citral, cinnamic aldehyde, isoeugenol) の感作性を検出できることが示された。しかし、この研究は感作源の検討品数が限定的であり、植物エキス中に含まれる可能性のある様々な感作性物質を検出可能か明確化するためには、より広範囲の感作性物質に対する検討が必要である。

一方、第1編 第1章では、KeratinoSens™と h-CLAT による組み合わせによって、物質の感作性の有無を高い予測性で判別することが可能であることを示した。OECD テストガイドラインとして収載されている *in vitro* 試験の中で、KeratinoSens™と h-CLAT は、

多成分および混合物の試験に技術的に適用可能である。しかし、正しくハザード判別ができる感作性物質でも、その物質が植物エキス中に低濃度しか含まれていない場合には、検出できない。したがって、植物エキス中の感作性物質の評価に対する適用性検証には、ハザード判別の観点に加えて、低濃度で含まれた場合にも検出できるかどうかという検出下限の観点からの考察が必要である。

本章では、植物エキスに対する *in vitro* 試験の適用性の明確化を目的として、植物エキス中の感作性物質の検出下限を LLNA と *in vitro* 試験で比較することを試みた。なお、本研究では、植物エキスが感作性試験で陽性と判定されるためには、評価した植物エキス中に感作性物質が検出下限以上で含まれていると推測されることに着目した。たとえば、LLNA で陽性と判定された植物エキス中には、感作性物質が EC3 (LLNA において SI 値が 3 を超えると推測される濃度) 以上で含まれていると推測される。次に、植物エキス中に含有されていると想定した上で、感作性物質の検出下限を比較した。しかし、天然由来の複雑な混合物である植物エキス中に含有される感作性物質を完全に予測することは困難であるため、本章では、検討対象を LLNA と *in vitro* 試験の結果を有する感作性物質データセット全般とし、データセットから明らかになったことを、植物エキスに含まれる未知の成分に適用することとした。これにより、植物エキス中に含有されている感作性物質に対して、LLNA と *in vitro* 試験のどちらが低い検出下限を有しているかを検証した。この際、植物エキスは水溶性であり、かつ細胞毒性を生じないこと、また感作性物質の検出下限が植物エキス中の他成分からマスキングの影響を受けないことを前提に検証した。加えて、h-CLAT による植物エキス中の感作源検出に際して、実際に植物エキス中の感作性物質以外の成分によるマスキング効果などの影響が生じることがないか pilot study を行った。

第1節 実験

1. 146物質のデータセット

LLNA と KeratinoSens™、h-CLAT のデータが存在する物質^{25, 29, 30})から、KeratinoSens™ と h-CLAT の組み合わせで LLNA に対して正しく陽性と判定した 147 物質を抽出した。さらに、3-methyl-1-phenylpyrazolone と streptomycin sulfate について、未報告の h-CLAT データを加えた。その上で、Benzo(a)pyrene については、最低試験濃度における stimulation index (SI) 値が 15 を超える値から外挿法によって EC3 値を算出していることから解釈が難しいため、検討対象から除外した⁵²)。また、1-benzoylacetone については EC3 値の出典がなく信頼性に乏しいために除外した。以上、benzo(a)pyrene と 1-benzoylacetone を除いた 146 物質について解析を行った (第5節 Table 2-1-5)。

2. 植物エキス中に含有されうる感作性物質の検出下限

2-1. KeratinoSens™

第1編 第1章 第1節にプロトコルについて記載した。KeratinoSens™は、多成分物質および混合物の試験に、技術的に適用可能である。

2-2. Human cell line activation test (h-CLAT)

第1編 第1章 第1節にプロトコルについて記載した。h-CLAT は、多成分物質および混合物の試験に技術的に適用可能である。

2-3. 植物エキス中に含有されていた際の感作性物質の検出下限

感作性物質の検出下限が植物エキス中の他成分からマスキングなどの影響を受けないことを前提に、感作性物質が植物エキス中に含有されていた際の検出下限を、EC3 (LLNA)、EC1.5 (KeratinoSens™) および MIT (h-CLAT) を基に見積もった (Table 2-1-1)。植物エキスが LLNA において刺激を誘導せず、未希釈を最高濃度として試験したと仮定した場合、植物エキス中の溶媒や他の成分による影響を考慮しないとすると、感作性物質が植物エキス中に含有されていた際の LLNA における検出下限は EC3 (SI 値が 3 を超えると推測される濃度) であった。一方で、*in vitro* 試験においては、植物エキスが培養液によって希釈された上で細胞に暴露されることを考慮する必要があった。KeratinoSens™については、分子量不明の植物エキスを評価するにあたり、細胞毒性を生じない場合、培養液に最高で 400 µg/mL で溶解させて試験する³²)。そのため、植物エキスは培養液で 2500 倍に希釈された上で、細胞に暴露される。したがって、感作性物質が植物エキス中に含有されていた際の KeratinoSens™における検出下限は EC1.5×2500 µg/mL と計算できた。その上で単位変換 (µg/mL から 10⁻⁴ %) を行い、感作

性物質が植物エキス中に含有されていた際の KeratinoSens™における検出下限を detection concentration of KeratinoSens™ (DC_K) として定義した ($EC1.5 \times 2500 \%$)。同様に、h-CLAT については植物エキスが生理食塩液に溶解し、かつ細胞毒性を生じない場合、培養液に最高で $5000 \mu\text{g/mL}$ で溶解させて試験することから³⁴⁾、感作性物質が植物エキス中に含有されていた際の検出下限は $MIT \times 200 \mu\text{g/mL}$ と計算できた。その上で単位変換 ($\mu\text{g/mL}$ から $10^{-4} \%$) し、感作性物質が植物エキス中に含有されていた際の h-CLAT における検出下限を detection concentration of h-CLAT (DC_h) として定義した ($MIT \times 200 \%$)。また、KeratinoSens™と h-CLAT による組み合わせによって評価を行った場合の検出下限は、 DC_K (KeratinoSens™) と DC_h (h-CLAT) が共に算出された場合、小さい方を minimal detection concentration (MDC) として定義した。また、KeratinoSens™と h-CLAT の一方でのみ陽性と判断され、 DC_K と DC_h の片方しか算出されない場合は、算出された方の値を MDC とした。

Table 2-1-1

EC3 (LLNA)、EC1.5 (KeratinoSens™) および MIT (h-CLAT) に基づいた植物エキス中に含有する感作性物質の検出下限

Sensitization test	Estimated exposure concentration exceeding positive criteria	Maximun exposing concentration	The dilution rate used to expose culture medium	Detection concentration in sensitizer in non-cytotoxic botanical extract
LLNA	EC3	100 [%]	1	EC3 [%]
KeratinoSens™	EC1.5	400 [µg/mL]	2500	EC1.5 ×2500 [µg/mL]
h-CLAT	MIT	5000 [µg/mL]	200	MIT ×200 [µg/mL]

h-CLAT における植物エキス中の他成分による影響検証

KeratinoSens™においては、細胞毒性を生じない植物エキスに関しては、感作性物質検出に際しマスキング効果やブースティング効果がほとんど生じないことが pilot study で確認されている⁵¹⁾。そのため、本章では h-CLAT における植物エキス中の他成分による影響について pilot study を行った。植物エキスは、植物エキスの抽出に用いられる代表的な溶媒である ethanol と 1,3-butylene glycol を用いることとし、80% ethanol に 2% の固形分が溶解した植物エキス A、50% 1,3-butylene glycol に 0.5% の固形分が溶解した植物エキス B を用いた。そして、h-CLAT の最高試験濃度である 5000 µg/mL で感作性物質の検出濃度に影響がなければ、マスキング効果やブースティング効果がほとんど生じないと考え、h-CLAT 暴露時の培養液中に 5000 µg/mL で植物エキスが共存する場合としない場合で感作性物質の評価に影響を及ぼすかを検討した。この際の感作性物質としては、cinnamomum camphora (camphor) bark oil に含まれる cinnamic aldehyde、litsea cubeba、さらに lemongrass oil に含まれる citral を用いて評価した。

第2節 結果

1. 感作性物質の検出下限の比較

データセットにおける感作性物質が仮に植物エキス中に含有されていたと想定した場合の LLNA と KeratinoSens™における検出下限について比較した（第5節）。各感作性物質における、LLNA の検出下限である EC3 と KeratinoSens™の検出下限である DC_K のプロットを Figure 2-1-1 (a) に示す。その結果、比較した 116 物質のうち 88 物質については KeratinoSens™の検出下限の方が低かった。つまり、データセットにおける感作性物質のうち 76% (88/116) の物質において植物エキス中に含有したと想定した場合、LLNA と比べて KeratinoSens™の方が低濃度で検出可能であった。さらに、LLNA と h-CLAT における検出下限の比較を行った。各感作性物質における、LLNA の検出下限である EC3 と h-CLAT の検出下限である DC_h のプロットを Figure 2-1-1 (b) に示す。その結果、比較した 128 物質のうち 104 物質については h-CLAT の検出下限の方が低かった。すなわち、データセットにおける感作性物質のうち 81% (104/128) の物質において植物エキス中に含有されたと想定した場合、LLNA に比べて h-CLAT の方が低濃度検出可能であった。

次に、LLNA における検出下限である EC3 と、KeratinoSens™と h-CLAT による組み合わせにおける検出下限である MDC について比較した。各感作性物質における、EC3 と MDC のプロットを Figure 2-1-1 (c) に示す。その結果、比較した 146 物質のうち 124 物質については LLNA と比べて MDC の方が低かった。したがって、データセットにおける感作性物質のうち 86% (124/146) 物質において植物エキス中に含有されていたと想定した場合、LLNA と比べて KeratinoSens™と h-CLAT による組み合わせの方が低濃度検出可能であった。これらの結果から、KeratinoSens™または h-CLAT 単独による評価（それぞれ 76%, 81%）よりも、KeratinoSens™と h-CLAT を組み合わせることによって、より多くの割合の物質を LLNA と比べて低濃度検出可能であることが示唆された（Table 2-1-2）。一方で、植物エキス中に含有されていたとしても LLNA と比べて KeratinoSens™と h-CLAT による組み合わせが低濃度検出できない物質は 21 物質存在した（Table 2-1-3）。

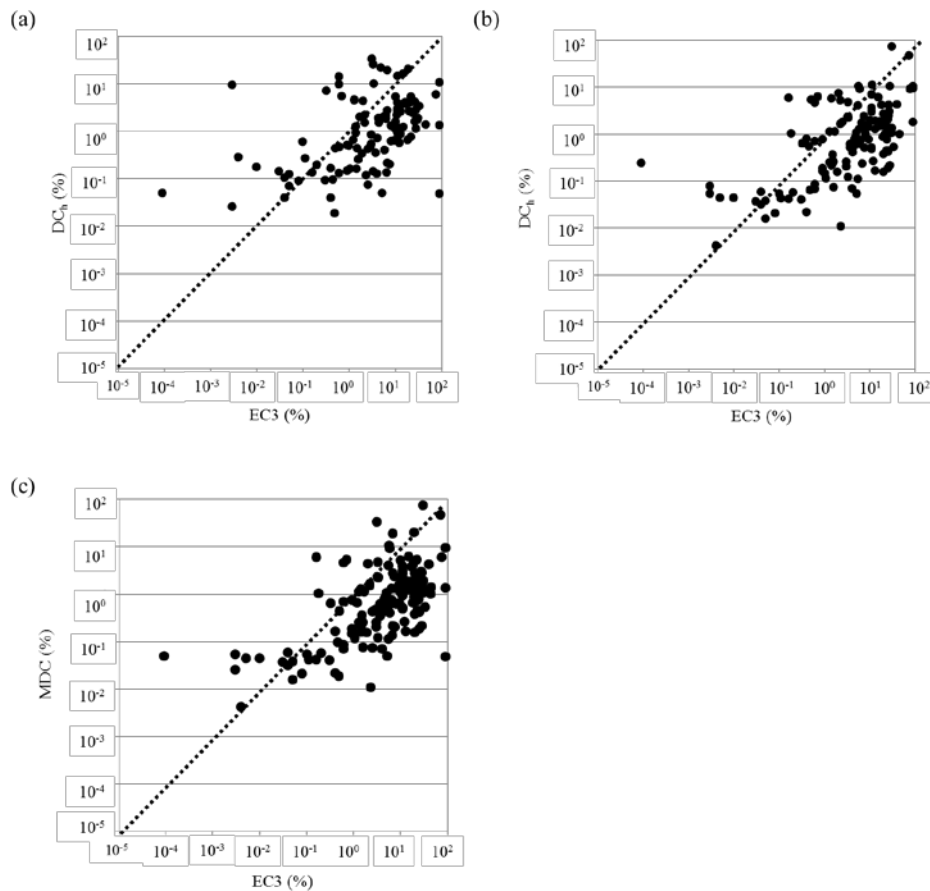


Figure 2-1-1 植物エキス中に含有されていた場合の感作性物質の検出下限比較

データセットにおける感作性物質が仮に植物エキス中に含有されていたと想定した場合の LLNA と KeratinoSens™における検出下限について、比較を行った。

(a) 感作性物質 116 品における LLNA の検出下限である EC3 と KeratinoSens™の検出下限である DC_K のプロット。横軸に EC3 を、縦軸に DC_K をプロットした。EC3 と DC_K が等しい感作性物質は点線上にプロットされた。植物エキス中に含有されていた場合に LLNA と比べて低濃度検出可能である感作性物質 ($DC_K < EC3$) は点線より下にプロットされ、LLNA と比べて低濃度検出できない感作性物質 ($DC_K > EC3$) は点線より上にプロットされた。プロットされた物質数について集計した結果を Table 2-1-2 に示す。

(b) 感作性物質 129 品における LLNA の検出下限である EC3 と h-CLAT の検出下限である DC_h のプロット。横軸に EC3 を、縦軸に DC_h をプロットした。EC3 と DC_h が等しい感作性物質は点線上にプロットされた。植物エキス中に含有されていた場合に LLNA と比べて低濃度検出可能である感作性物質 ($DC_h < EC3$) は点線より下にプロットされ、LLNA と比べて低濃度検出できない感作性物質 ($DC_h > EC3$) は点線より上にプロットされた。プロットされた物質数について集計した結果を Table 2-1-2 に示す。

(c) 感作性物質 146 品における LLNA の検出下限である EC3 と MDC のプロット。横軸に EC3 を、縦軸に MDC をプロットした。EC3 と MDC が等しい感作性物質は点線

上にプロットされた。植物エキス中に含有されていた場合に LLNA と比べて低濃度検出可能である感作性物質 ($MDC < EC3$) は点線より下にプロットされ、LLNA と比べて低濃度検出できない感作性物質 ($MDC > EC3$) は点線より上にプロットされた。プロットされた物質数について集計した結果を Table 2-1-2 に示す。

Table 2-1-2

植物エキス中に含有されていたと想定した際に、LLNA と比べて低濃度検出可能である感作性物質の割合

	KeratinoSens TM	h-CLAT	Binary test battery
Analysed chemicals	116	128	145
Lower detection concentration vs. LLNA	88	104	124
Ratio	76%	81%	86%

Table 2-1-3

植物エキス中に含有されていたと想定した際に、LLNA と比べて KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせにおいて、低濃度検出できない 21 物質

Chemicals	CAS	LLNA	Binary test battery	Discussion
		EC3 [%]	MDC [%]	
Diphenylcyclopropenone	886-38-4	0.003	0.03	Lipophilic, LogKow=3.25
Oxazolone	15646-46-5	0.003	0.05	
Chlorothalonil	1897-45-6	0.004	0.0042	Lipophilic, LogKow=3.66
MCI/MI	26172-55-4 & 2682-20-4	0.0050	0.044	
1,4-Benzoquinone	106-51-4	0.0099	0.04	
Dinitrofluorobenzene	70-34-8	0.03	0.04	
Tetrachlorosalicylanilide	1154-59-2	0.04	0.06	Lipophilic, LogKow=5.87
Maleic anhydride	108-31-6	0.16	5.97	Susceptible to hydrolysis
Hexyl salicylate	6259-76-3	0.18	1.05	LLNA false-positive(Urbish et al., 2015)
Propyl gallate	121-79-9	0.32	0.65	Putative pre-/pro-hapten(Joanna et al, 2015)
chloramine T	127-65-1	0.6	4.68	Putative pre-/pro-hapten(Joanna et al, 2015)
Cobalt chloride	7646-79-9	0.6	0.71	
2-Methyl-4H,3,1-benzoxazin-4-one	525-76-8	0.7	5.44	
24-Dinitrobenzenesulfonic acid sodium salt	885-62-1	2	4.36	
Allyl phenoxyacetate	7493-74-5	3.1	33.51	
Diethyl sulphate	64-67-5	3.3	4.81	
3,4-Dihydrocoumarin	119-84-6	5.6	10.63	
Anisyl Alcohol	105-13-5	5.9	9.23	Putative pre-/pro-hapten(Joanna et al, 2015)
Dihydroeugenol (2-methoxy-4-propyl-phenol)	2785-87-7	6.8	19.20	Putative pre-/pro-hapten(Joanna et al, 2015)
1-Iodohexadecane	544-77-4	19	20.28	Lipophilic, LogKow=8.96
Penicillin G	61-33-6	30	75.09	

2. h-CLAT における植物エキス中の他成分による影響検証

5000 µg/mL の植物エキス A が存在する場合としない場合の cinnamic aldehyde、citral の評価をガイドラインに示されたプロトコル³⁴⁾に基づいて実施し、EC150 および EC200 比較した。その結果、CD86 の発現上昇がカットオフ値を超える EC150 は同等であった (Table 2-1-4 (a))。また、CD54 の発現上昇がカットオフ値を超える EC200 は同等であった。植物エキスが存在しない場合の結果は、historical data を使用した (第 1 編 第 1 章)。さらに、5000 µg/mL の植物エキス B が存在する場合としない場合の cinnamic aldehyde、citral の評価を比較した。その結果、cinnamic aldehyde、citral の EC150 および EC200 は同等であった (Table 2-1-4 (b))。

Table 2-1-4

(a) 5000 µg/mL の植物エキス A が存在する場合としない場合の h-CLAT 結果

(b) 5000 µg/mL の植物エキス B が存在する場合としない場合の h-CLAT 結果

(a)

Botanical extract	Spiking sensitizer	CD86	EC150 [µg/mL]	CD54	EC200 [µg/mL]
Extract A	No	-(0/2)	-	-(0/2)	-
Extract A	Cinnamic aldehyde	+(3/3)	5.4	+(3/3)	10.2
No extract	Cinnamic aldehyde	+(3/3)	10.2	+(3/3)	12.3
Extract A	Citral	+(2/3)	15.4	+(3/3)	12.3
No extract	Citral	+(3/3)	8.4	+(3/3)	15.0

(b)

Botanical extract	Spiking sensitizer	CD86	EC150 [µg/mL]	CD54	EC200 [µg/mL]
Extract B	No	-(0/2)	-	-(0/2)	-
Extract B	Cinnamic aldehyde	+(3/3)	4.8	+(3/3)	4.5
No extract	Cinnamic aldehyde	+(3/3)	10.2	+(3/3)	12.3
Extract B	Citral	+(3/3)	13.5	+(3/3)	14.6
No extract	Citral	+(3/3)	8.4	+(3/3)	15.0

植物エキスが存在しない場合の結果は、historical data を使用した。

第3節 考察

本章の目的は、植物エキスに対する *in vitro* 試験の適用性を明らかにすることであった。この目的のために、植物エキス中に含まれる感作性物質に対する *in vitro* 試験の検出感度を明確化する必要があった。そこで本研究は、LLNA と KeratinoSens™、h-CLAT のデータが存在する 146 物質について、植物エキス中に含有されていると想定し、感作性物質の検出下限を比較した。データセットには、天然由来の混合物中に含有される可能性が考えにくい構造の物質も含まれていたが、検討対象を感作性物質データセット全般へと拡張し、データセットから明らかになったことを植物エキスに含まれる未知の成分に適用することとした。この際、植物エキスは水溶性で、かつ細胞毒性を生じないこと、また感作性物質の検出下限が植物エキス中の他成分からマスキングなどの影響を受けないことを前提に検証を行った。

感作性物質が植物エキス中に含有されていた際の検出下限を、EC3 (LLNA)、EC1.5 (KeratinoSens™) および MIT (h-CLAT) を基に見積もった。その上で、データセットにおける感作性物質が仮に植物エキス中に含有されていた場合の、LLNA と KeratinoSens™、LLNA と h-CLAT、LLNA と KeratinoSens™と h-CLAT による組み合わせにおける検出下限について比較した。LLNA と KeratinoSens™の検出下限を比較した結果、76%の感作性物質については KeratinoSens™の検出下限の方が低かった。また、LLNA と h-CLAT の検出下限を比較した結果、81%の感作性物質については h-CLAT の検出下限の方が低かった (Table 2-1-2)。さらに、LLNA と KeratinoSens™と h-CLAT による組み合わせにおける検出下限について比較した結果、86%の感作性物質については LLNA と比べて KeratinoSens™と h-CLAT による組み合わせの検出下限の方が低かった (Table 2-1-2)。このことから、感作性物質以外の成分が検出下限に影響を与えないことを前提にした場合、KeratinoSens™と h-CLAT を用いることで、植物エキス中の感作性物質を LLNA と同等以上に低濃度検出可能であることが示唆された。さらに、KeratinoSens™と h-CLAT 単独による評価よりも、KeratinoSens™と h-CLAT を組み合わせることによって、より多くの物質を LLNA と比べて低濃度検出可能であることが示唆された。したがって、ハザード検出の観点だけでなく、検出下限の観点においても、KeratinoSens™と h-CLAT による組み合わせによってお互いの試験を補うことができ、高感度な評価が可能であると示唆された。

h-CLAT において植物エキス中の他成分による影響検証を行った結果、最大暴露濃度である 5000 µg/mL の植物エキスが存在する場合としない場合で、EC150、EC200 に大きな差は認められなかった。このことから、植物エキス中に含まれる感作性物質を検出する際、植物エキス中の他成分によるマスキング効果は生じないことが示唆された。KeratinoSens™における過去の Pilot study においても、細胞毒性を生じない植物エキス中に含まれる感作性物質を検出する際にマスキング効果がほとんど生じないことが確

認められている⁵¹⁾。以上より、植物エキス中に含有された感作性物質の検出下限は、植物エキス中の他成分によるマスクング効果が生じないという前提の下で、感作性物質データセットに収載されている MIT (h-CLAT) および EC1.5 (KeratinoSens™) に希釈率を考慮した上で、第2節 2-3 に示したように算出できることが示唆された。

本章の結果より、KeratinoSens™と h-CLAT を用いた感作性評価によって、植物エキス中に含有した感作性物質を LLNA より低濃度で検出できることが示唆された。これは、LLNA では被験物質が経皮吸収された上で感作が誘導されるのに対し、*in vitro* 試験法では化学物質が細胞に直接暴露されることが、理由の1つとして推測された。

EC3 と MDC の比較から、植物エキス中に感作性物質が含有されていたとしても、LLNA と比べて KeratinoSens™と h-CLAT による組み合わせが低濃度検出できない感作性物質が存在しうることも明らかになった。今回解析した 146 物質のうち 21 物質が、EC3 よりも MDC が大きかった (Table 2-1-3)。さらに、その 21 物質のうち、hexyl salicylate については RIFM data base に基づく HRIPT、HMT の結果 (HRIPT で 35,433 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ で反応なし、HMT で 20,654 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ で反応なし) から LLNA で偽陽性の可能性があることが報告されている²⁵⁾。また、maleic anhydride は無水物であるため、植物エキスを製造する際の水系を含む様々な抽出過程や化粧品へ配合する過程で加水分解され、実際上皮膚感作性の懸念の小さい物質へと変化する可能性が考えられた。Hexyl salicylate と maleic anhydride の 2 品を除いた 19 物質のうち、chlorothalonil と tetrachlorosalicylanilide、1-iodohexadecane は LogKow > 3.5 の親油性物質である。親油性の感作性物質は、培養液への溶解性の低さが評価物質の細胞への暴露を制限しているために、KeratinoSens™と h-CLAT において皮膚感作性を正しく検出できず、偽陰性となる可能性があることが言及されている^{32,34)}。この 3 物質についてはハザード検出の点では正しく陽性と判定されているものの、培養液への溶解性の低さが評価物質の細胞への暴露を制限しているために、感作性の検出に際しより高濃度の暴露が必要となり、検出下限が高くなった可能性があった。これに加え、diphenylcyclopropanone の LogKow は 3.26 であり、ハザード検出の点でポテンシャルを正しく検出できない可能性が言及されている LogKow = 3.5³²⁾ よりも低いものの、chlorothalonil と tetrachlorosalicylanilide、1-iodohexadecane の 3 物質と同様に培養液への溶解性の悪さが評価物質の細胞への暴露を制限しているために検出下限が高くなる可能性が考えられた。MCI/MI, propyl gallate, chloramine T, anisyl alcohol, dihydroeugenol については代謝かつ/または酸化の影響を受ける可能性のある物質であると示唆されている³⁰⁾。したがって、*in vitro* 試験では酸化/代謝の影響を反映しきれていないために、これら 4 物質の検出下限が高くなった可能性が示唆された。これら加水分解される物質、親油性物質、pre-/pro-hapten は、これまでの報告から *in vitro* 試験における感作性の有無の評価に対する適用性について限界があることが指摘されている²⁵⁾。本章の結果から感作性の有無の評価だけでなく、植物エキス中に含まれた微量の感作性物質に対する検出下限の観点でも、正しい評価が困難となる可能性があるこ

とが示唆された。

仮に EC3 よりも MDC が大きい感作源が植物エキス中に含有されている場合、その濃度が EC3 以上、MDC 未満である際には、LLNA で陽性となる植物エキスが KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせによって偽陰性判定される場合がある。In vitro 試験で評価した植物エキスを化粧品に配合する際には、このような EC3 よりも MDC が大きい物質が植物エキス中に含有されているリスクも考慮する必要がある。本章における検討に加えて、ハザード検出の観点からも、KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせでは偽陰性物質が存在することが明らかになっており（第1編 第1章）、KeratinoSens™ と h-CLAT で評価した植物エキスを化粧品に配合する際には、このような KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせにおける偽陰性物質についても植物エキス中に含有されているリスクを考慮する必要がある。

本章では、次の3つの前提条件を想定した上で検討を行った。1つ目に、検討対象を感作性物質データセットへと拡張し、データセットから明らかになったことを植物エキスに含まれる未知の成分に適用することとした。データセットには天然由来の混合物中に含有される可能性が考えにくい構造の物質も含まれているが、天然由来の混合物中に含有される可能性を捨て去ることができないことから保守的に考えて、本章ではデータセットの全ての物質を対象として検証を行った。2つ目に、植物エキスは水溶性で、かつ細胞毒性を生じないものとして検討した。実際に、化粧品において使用される植物エキスは水やエタノールなどの溶媒に植物の成分を抽出したものであることが多く、その場合 KeratinoSens™ と h-CLAT の最高暴露濃度から試験を実施したとしても細胞毒性が生じない。したがってこの前提は、essential oil などの油溶性の抽出物や、細胞毒性を生じうる抽出成分を高濃度濃縮させた植物エキスを除いて、多くの植物エキスに適用することができる。3つ目に、感作性物質の検出下限が植物エキス中の他成分からマスキングなどの影響を受けないと仮定して検証を行った。KeratinoSens™ と h-CLAT については、この前提が妥当であることが示唆されている⁵¹⁾。一方で LLNA においては、これまで具体的な検証がなされているわけではない。しかし、新規に動物実験を行って、追加検証を行うことは、動物愛護の観点から適切ではない。これまで、植物エキス中の特定成分が感作性物質評価に影響するという報告がなされていないことから、本章では植物エキス中の他成分の影響が出ないことを前提に検出下限の議論を行った。今後、動物やヒトにおいて他成分の評価へ明らかな影響が想定される物質を含有する植物エキスについては、in vitro 代替法でもその他成分の評価への影響が捉えられるか慎重に検証する必要がある。

第4節 小括

本章では植物エキスに対する *in vitro* 試験の適用性を明らかにすることを目的に、感作性物質の検出下限に着目し、*in vitro* 試験と LLNA における、植物エキス中に含有されうると仮定した感作性物質の検出下限を、データセット中の値を用いて比較した。この研究によって、これまでは高純度・単一の物質の評価が中心に行われてきたのに対し、KeratinoSens™と h-CLAT において、植物エキス中に含有されている感作性物質を LLNA と同等以上に検出できることが、検出下限の比較から明らかになった (Table 2-1-2)。一方で、油溶性の抽出物や細胞毒性を生じうる植物エキスなどは、*in vitro* 試験の評価において限界となりうることも明確化された。さらに、植物エキス中に含有された場合に LLNA に比べて検出下限が高くなる感作性物質が存在することも見出された (Table 2-1-3)。以上より、*in vitro* 試験で評価した植物エキスを化粧品に配合する際には、それらの感作性物質についても植物エキス中に含有されうるリスクを考慮した評価戦略の構築が望まれる。

第5節 Table 2-1-5 146物質のデータセット

Chemicals	CAS	LLNA	KeratinoSens™	h-CLAT	Binary test battery
		EC3 [%]	DC _K [%]	DC _h [%]	MDC [%]
Diphenylcyclopropenone	886-38-4	0.003	0.03	0.08	0.03
Oxazolone	15646-46-5	0.003	9.53	0.05	0.05
Chlorothalonil	1897-45-6	0.004	0.29	0.00	0.00
MCI/MI	26172-55-4 & 2682-20-4	0.005	-	0.04	0.04
1,4-Benzoquinone	106-51-4	0.0099	0.18	0.04	0.04
Dinitrofluorobenzene	70-34-8	0.03	0.15	0.04	0.04
Tetrachlorosalicylanilide	1154-59-2	0.04	0.10	0.06	0.06
Bandrowski's Base	20048-27-5	0.04	0.04	0.03	0.03
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	0.05	0.13	0.04	0.04
4-Nitrobenzyl bromide	100-11-8	0.05	0.07	0.02	0.02
Potassium dichromate	7778-50-9	0.08	0.09	0.02	0.02
Glutaraldehyde	111-30-8	0.1	0.61	0.05	0.05
1,4-Dihydroquinone	123-31-9	0.11	0.27	0.04	0.04
1,4-Phenylenediamine	106-50-3	0.16	0.14	0.04	0.04
Maleic anhydride	108-31-6	0.16	-	5.97	5.97
Hexyl salicylate	6259-76-3	0.18	-	1.05	1.05
Benzyl bromide	100-39-0	0.2	0.20	0.06	0.06
Lauryl gallate	1166-52-5	0.3	0.09	0.04	0.04
Propyl gallate	121-79-9	0.32	7.05	0.65	0.65
2-Aminophenol	95-55-6	0.4	0.04	0.02	0.02
2,5-Diaminotoluene sulfonate	615-50-9	0.4	0.16	0.80	0.16
Methyl-2-octynoate / Methyl heptine carbonate	111-12-6	0.45	0.10	0.56	0.10
N N-dimethyl-4-nitrosoaniline	138-89-6	0.48	0.02	0.06	0.02
2-Nitro-4-phenylenediamine	5307-14-2	0.5	0.44	5.53	0.44
4-(N-Ethyl-N-2-methan-sulphonamido-ethyl)-2-methyl-1,4-phenylenediamine (CD3)	25646-71-3	0.6	0.13	0.07	0.07
chloramine T	127-65-1	0.6	14.14	4.68	4.68
Cobalt chloride	7646-79-9	0.6	9.69	0.71	0.71
Formaldehyde	50-00-0	0.61	0.47	0.09	0.09
2-Methyl-4H,3,1-benzoxazin-4-one	525-76-8	0.7	5.44	6.39	5.44
Iodopropynyl butylcarbamate	55406-53-6	0.9	0.15	0.16	0.15
1,2 dibromo 2,4 dicyanobutane	35691-65-7	0.9	0.52	0.19	0.19
Squaric acid diethyl ester	5231-87-8	0.9	-	0.77	0.77

3-Methylcatechol	488-17-5	1	0.49	0.15	0.15
5-Methyl-2-hepten-4-one	81925-81-7	1.06	0.16	0.12	0.12
Isoeugenol	97-54-1	1.2	0.66	-	0.66
1-Naphthol	90-15-3	1.3	4.67	0.25	0.25
1-Phenyl-1,2-propanedione	579-07-7	1.3	4.49	1.13	1.13
2-Hydroxyethyl acrylate	818-61-1	1.4	0.94	0.22	0.22
Glyoxal	107-22-2	1.4	1.29	5.73	1.29
4-Amino-m-cresol	2835-99-6	1.45	0.16	0.23	0.16
Bisphenol A-diglycidyl ether	1675-54-3	1.5	0.44	0.37	0.37
4-Vinyl pyridine	100-43-6	1.6	0.26	0.08	0.08
1-Vinyl pyridine	1337-81-1	1.6	0.26	0.26	0.26
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	1.7	2.01	1.15	1.15
2-Methyl-2H-isothiazolone	2682-20-4	1.9	0.34	0.16	0.16
24-Dinitrobenzenesulfonic acid sodium salt	885-62-1	2	4.36	7.44	4.36
3-Dimethylaminopropylamine	109-55-7	2.2	2.19	1.64	1.64
Ethylene diamine	107-15-3	2.2	1.50	5.31	1.50
1,2-Benzisothiazolin-3-one	2634-33-5	2.3	0.12	0.01	0.01
Methyl-2-nonynoate	111-80-8	2.5	0.08	1.84	0.08
trans-2-decenal	3913-71-1	2.5	0.44	-	0.44
Benzyl salicylate	118-58-1	2.9	0.48	-	0.48
Phenyl acetaldehyde	122-78-1	3	0.86	0.26	0.26
Cinnamic aldehyde	104-55-2	3	0.53	0.20	0.20
Allyl phenoxyacetate	7493-74-5	3.1	33.51	-	33.51
3-Aminophenol	591-27-5	3.2	-	2.34	2.34
trans- α -Damascone	24720-09-0	3.3	0.14	0.12	0.12
Diethyl sulphate	64-67-5	3.3	25.66	4.81	4.81
5-Amino-2-methylphenol	2835-95-2	3.4	10.01	2.26	2.26
3-Propylidene-phthalide	17369-59-4	3.7	-	0.62	0.62
Benzylidene acetone	122-57-6	3.7	0.35	0.52	0.35
24-Heptadienal	5910-85-0	4	0.13	0.07	0.07
Farnesol	4602-84-0	4.1	0.72	0.42	0.42
p-t-Butyl-dihydrocinnamaldehyde (Bourgenol)	18127-01-0	4.3	-	0.54	0.54
Tropolone	533-75-5	4.3	1.91	0.55	0.55
5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	21834-92-4	4.4	1.78	0.66	0.66
α -methyl-trans-cinnamaldehyde	101-39-3	4.5	1.51	0.82	0.82
Nickel sulfate	10101-97-0	4.8	21.62	0.90	0.90
6-Methyl-3-5-heptadien-2-one	1604-28-0	5	1.88	1.09	1.09
Tetramethylthiuramdisulfide	137-26-8	5.2	0.05	0.05	0.05
trans-2-Hexenal	6728-26-3	5.5	2.05	0.11	0.11
Resorcinol	108-46-3	5.5	-	4.03	4.03
3,4-Dihydrocoumarin	119-84-6	5.6	-	10.63	10.63
2-methoxy-4-methylphenol	93-51-6	5.8	-	0.62	0.62
Diethyl maleate	141-05-9	5.8	0.40	1.28	0.40
Anisyl Alcohol	105-13-5	5.9	-	9.23	9.23
Dibenzyl ether	103-50-4	6.3	1.87	1.32	1.32
2-Phenylpropionaldehyde	93-53-8	6.3	2.17	0.76	0.76
4-chloroaniline	106-47-8	6.5	0.14	1.75	0.14
α -Damascone	23726-91-2	6.7	0.22	0.24	0.22
Undec-10-enal	112-45-8	6.8	2.80	-	2.80
Dihydroeugenol (2-methoxy-4-propyl-phenol)	2785-87-7	6.8	19.20	-	19.20
Isocyclocitral	1335-66-6	7.3	-	2.41	2.41
1,1,3-Trimethyl-2-formylcyclohexa-2,4-diene (Safranal)	116-26-7	7.5	0.20	0.53	0.20
Perillaaldehyde	2111-75-3	8.1	0.63	1.03	0.63
Methyl methanesulphonate	66-27-3	8.1	1.32	-	1.32
3-Methyl-1-phenylpyrazolone	89-25-8	8.5	-	7.11	7.11
p-Isobutyl- α -methyl hydrocinnamaldehyde	6658-48-6	9	-	1.44	1.44
124-Benzenetricarboxylic anhydride (Trimellitic anhydride)	552-30-7	9.2	-	1.62	1.62
1-(p-Methoxyphenyl)-1-penten-3-one	104-27-8	9.3	0.64	0.79	0.64
2-Methylundecanal	110-41-8	10	1.12	-	1.12
1-Bromohexane	111-25-1	10	5.29	-	5.29
2-Ethylhexyl acrylate	103-11-7	10	1.61	2.00	1.61

Carvone	99-49-0	10.7	2.18	1.90	1.90
Hexyl cinnamic aldehyde	101-86-0	11	0.93	-	0.93
Menthadiene-7-methyl formate	68683-20-5	11	3.98	7.14	3.98
α -Amyl cinnamic aldehyde	122-40-7	11	0.73	0.52	0.52
Cinnamyl nitrile	1885-38-7	11	14.66	3.10	3.10
Butyl acrylate	141-32-2	11	1.21	3.68	1.21
2,3-Butanedione	431-03-8	11	3.05	0.49	0.49
(3E)-4-methyl-3-decen-5-one	811412-48-3	11.1	2.69	11.17	2.69
Farnesal	502-67-0	12	0.57	0.27	0.27
R-Carvone	6485-40-1	12.9	3.63	1.90	1.90
Eugenol	97-53-0	12.9	2.61	1.29	1.29
Citral	5392-40-5	13	0.88	0.17	0.17
Abietic acid	514-10-3	15	1.25	-	1.25
Oxalic acid anhydrous	144-62-7	15	16.14	6.21	6.21
α -Methyl-1 3-benzodioxole- 5-propionaldehyde	1205-17-0	16.4	4.14	1.86	1.86
Benzyl benzoate	120-51-4	17	3.85	-	3.85
Lyral	31906-04-4	17.1	3.78	1.50	1.50
4-Allylanisole	140-67-0	18	-	4.15	4.15
Benzyl Cinnamate	103-41-3	18.4	0.65	-	0.65
1-Iodohexadecane	544-77-4	19	20.28	-	20.28
Lilial	80-54-6	19	-	0.89	0.89
Phenyl benzoate	93-99-2	20	-	2.76	2.76
Pentachlorophenol	87-86-5	20	-	0.38	0.38
Methyl acrylate	96-33-3	20	2.67	0.16	0.16
Cinnamic alcohol	104-54-1	21	4.14	2.03	2.03
α -iso-Methylionone	127-51-5	21.8	-	1.05	1.05
Cyclamen aldehyde	103-95-7	22	5.32	-	5.32
Benzocaine	94-09-07	22	0.75	1.48	0.75
cis-6-nonenal	2277-19-2	23	4.27	0.46	0.46
4-Methoxy- α -methyl benzenpropanal	5462-06-6	23.63	2.42	1.42	1.42
Imidazolidinyl urea	39236-46-9	24	4.41	0.79	0.79
α -Amylcinnamyl alcohol	101-85-9	25	-	0.45	0.45
Isocyclogeraniol	68527-77-5	25	-	2.10	2.10
OTNE	54464-57-2	25.1	-	0.42	0.42
Ethoxymethoxycyclododecane	58567-11-6	25.1	-	0.19	0.19
Geraniol	106-24-1	26	4.24	2.46	2.46
5-Methyl-2,3-hexanedione	13706-86-0	26	1.60	4.23	1.60
2266-Tetramethyl-35-heptanedione	1118-71-4	27	-	3.06	3.06
Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	28	2.84	10.71	2.84
Ethyl acrylate	140-88-5	28	1.14	0.22	0.22
3-Trimethyl benzenepropanol	103694-68-4	30	1.73	1.06	1.06
Linalool	78-70-6	30	-	1.37	1.37
Penicillin G	61-33-6	30	-	75.09	75.09
Butyl glycidyl ether	2426-08-6	31	1.93	-	1.93
Hydroxycitronellal	107-75-5	33	3.42	0.54	0.54
R(+)-Limonene	5989-27-5	40	-	4.33	4.33
d,l-Citronellol	106-22-9	44	-	1.01	1.01
2,2-Bis-[4-(2-hydroxy-3-methacryloxypropoxy)phenyl]-propane (Bis-GMA)	1565-94-2	45	1.40	-	1.40
Pyridine	110-86-1	72	-	47.40	47.40
Diethyl acetaldehyde	97-96-1	76	5.97	9.20	5.97
Aniline	62-53-3	89	0.05	10.74	0.05
1-Iodohexane	638-45-9	90	1.36	1.82	1.36
Methylmethacrylate	80-62-6	90	10.62	9.59	9.59

第2章 *In vitro* 評価技術と感作閾値の統合による植物エキスのリスクアセスメント技術の構築と実践

本研究では、植物エキスに対する KeratinoSens™と h-CLAT（第1編 第1章）の適用性の明確化に向けて、植物エキス中の感作性物質の検出下限に関する検証を行ってきた（第2編 第1章）。その結果、検証した146物質のうち86%の感作性物質についてはLLNAと比べてKeratinoSens™とh-CLATによる組み合わせの検出下限の方が低かった。一方で、14%（21品）の感作性物質については、LLNAと比べてKeratinoSens™とh-CLATによる組み合わせの検出下限の方が高かった。仮に植物エキス中にこれらの感作性物質が含まれ、含有濃度がLLNAの検出下限以上、KeratinoSens™とh-CLATによる組み合わせの検出下限未満である場合、LLNAで陽性となる植物エキスをKeratinoSens™とh-CLATによる組み合わせによって偽陰性判定してしまう懸念があった。*In vitro* 試験で評価した植物エキスを化粧品に配合する際には、このような物質が植物エキス中に含有されているリスクも考慮する必要がある。

感作リスクはハザード評価（NESILが小さいほど強感作性）と消費者の実使用をふまえた暴露量評価に基づいてアセスメントすることができる。植物エキスに対する動物を用いない感作性評価としては、機器分析を用いて毒性成分を定性・定量した上でリスクアセスメントを行う手法が提案されてきた^{49,50}。さらに、暴露量が少ない場合には、動物実験を行わないリスクアセスメントとして **dermal sensitization threshold（DST）** が提案されてきた^{11,15,16}。DSTとは、あらゆる化学物質についてそれ以下の暴露量では明らかな有害影響が現れないとするヒト暴露量の閾値である **threshold of toxicological concern（TTC）** の考え方¹⁷を基に開発され、感作性評価を行っていない化学物質に対しても大きな感作リスクを生じない皮膚暴露量として提案された¹⁵。Saffordら（2015）は、化学構造を決定したうえで、その化学物質の反応性に基づいて **non-reactive DST 900 µg/cm²**（反応性の低い **non-reactive** 物質）あるいは **reactive DST 64 µg/cm²**（反応性の高い **reactive** 物質）を用いることを提案した¹⁶。しかし、複雑な混合物である植物エキス中の感作性物質を **non-target** の網羅分析から定性・定量することは多くの時間を要し、困難である。そのため、暴露量が少なかったとしても、未知の成分を含む植物エキスにDSTを適用し、暴露量の観点のみで感作リスクアセスメントを行うことは困難であった。

そこで本研究では、多成分物質および混合物の試験に、技術的に適用可能であるKeratinoSens™とh-CLATによる組み合わせによるハザード評価に、暴露量の観点を組み合わせて、感作リスクアセスメント評価戦略の構築を目指した。まず著者は、KeratinoSens™とh-CLATの組み合わせで陰性となった植物エキスにおいても、感作性物質が微量に含まれる懸念が残ることに着目した（第1編 第2章）。植物エキスが感作性試験で陽性と判定されることは、評価した植物エキス中に感作性物質が検出下限以上で含まれていることを意味する。植物エキスに含まれる感作性物質の濃度が予想できれ

ば、植物エキスの暴露量に基づいて、それに含まれる感作性物質の暴露量も算出できる。感作誘導には閾値が存在し、感作性物質には動物実験やヒト試験の結果に基づいてそれぞれ設定される固有の NESIL が存在する^{53, 10)}。植物エキス中に感作性物質が含まれていても、その感作性物質の NESIL 以下の暴露量であれば大きなリスクを生じない。さらに、植物エキスに含まれる感作性物質の濃度が予想できれば、植物エキス中の感作性物質がその NESIL を超えないような植物エキスの暴露量を算出できる。この NESIL を超えないような植物エキスの暴露量を、感作性物質を含んでいる可能性のある植物エキスの NESIL (botanical NESIL) として定義した。その上で、botanical NESIL を未知の成分を含む植物エキスへ適用するアプローチを検討した。

第1節 実験

1. 解析対象：KeratinoSens™、h-CLAT で LLNA に対して正しく陽性と判定した 146 物質

第2編 第1章において、KeratinoSens™、h-CLAT で LLNA に対して正しく陽性と判定した 146 物質について解析を行った。

2. アプローチ

2-1. KeratinoSens™

第1編 第1章 第1節にプロトコルについて記載した。

2-2. Human cell line activation test (h-CLAT)

第1編 第1章 第1節にプロトコルについて記載した。

2-3. 植物エキス中に含有されていた際の感作性物質の検出下限

第2編 第1章 第1節の 2-3 に算出過程について記載した。

検出下限の設定においては、次の3つの前提条件を仮定した上で算出を行った。1つ目に、検討対象を感作性物質データセット全般へと拡張し、データセットから明らかになったことを植物エキスに含まれる未知の成分に適用することとした。データセットには天然由来の混合物中に含有される可能性が考えにくい構造の物質も含まれているが、可能性を捨て去ることができないことから保守的に考えて、本章ではデータセットの全ての物質を対象として検証を行った。2つ目に、植物エキスは水溶性で、かつ細胞毒性を生じないことを前提とした。3つ目に、感作性物質の検出下限が植物エキス中の他成分からマスクングなどの影響を受けないことを前提に検証を行った。

2-4. KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせで陰性となった植物エキスの NESIL (botanical NESIL) の算出

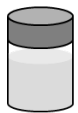
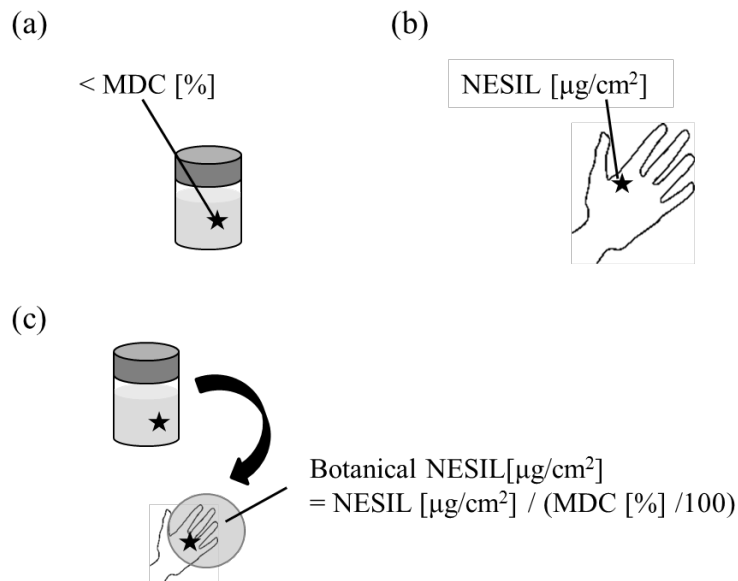
KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせによるハザード評価に加えて、以下に示すように感作リスクアセスメントを行うことを試みた (Figure 2-2-1)。

- KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせで陰性となった植物エキスに含まれる感作性物質について、植物エキスに含まれる感作性物質の濃度は、その検出下限である MDC 未満であると予想できる (Figure 2-2-1a)。
- EC3 値に基づいて感作性物質固有の NESIL が推算可能である。LLNA 実施時の被験物質の暴露量がマウスの耳 1 cm²あたり 25 µl であることから、EC3×250 µg/cm²

と推算できる¹¹⁾。この際、ヒト NESIL が存在するものについても、全て EC3×250 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ を NESIL とした (Figure 2-2-1b)。LLNA の EC3 からヒトの NESIL を算出する際に、Safford らと同様に、LLNA と HRIPT の相関を基に行い、追加の外挿は行わなかった^{53, 54)}。

- c. この2点をふまえて、KeratinoSensTMと h-CLAT による組み合わせで陰性となった場合の NESIL (botanical NESIL) を次の関係式から算出した (Figure 2-2-1c)。Botanical NESIL は、植物エキス中の個々の成分に対してではなく、KeratinoSensTMと h-CLAT による組み合わせで陰性となった植物エキスの有姿の暴露量に適用されるべき値である。

$$\text{Botanical NESIL } [\mu\text{g}/\text{cm}^2] = \text{NESIL } [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ (of putative sensitizer in botanical extract)}] / (\text{MDC } [\%] / 100)$$



: Botanical extract (Binary test Battery with KeratinoSensTM and h-CLAT: Negative)

★ : Sensitizer in botanical extract

Figure 2-2-1

KeratinoSensTM と h-CLAT による組み合わせで陰性となった植物エキスの NESIL (botanical NESIL) の算出

- (a) KeratinoSensTM と h-CLAT による組み合わせで陰性となった植物エキスについて、植物エキスに含まれる感作性物質の濃度は、その検出下限である MDC 未満であると予想
- (b) EC3 値に基づいて感作性物質固有の NESIL を推算
- (c) a および b に基づいて、KeratinoSensTM と h-CLAT による組み合わせで陰性となった植物エキスの NESIL (botanical NESIL) を算出

加えて、上記の通り Botanical NESIL は各感作性物質の MDC (KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせにおける検出下限；第 2 編 第 1 章 第 1 節 2-3) および LLNA EC3 から、Figure 2-2-1 のように推測した感作性物質固有の NESIL を基に算出される値である。このことから、botanical NESIL は、以下の関係式に示される通り MDC/EC3 比に逆相関するといえた。

$$\text{NESIL} = \text{EC3} \times 250 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \quad (1)$$

$$\text{Botanical NESIL} [\mu\text{g}/\text{cm}^2] = \text{NESIL} [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ (植物エキス中の感作性物質)}] / (\text{MDC} / 100) \quad (2)$$

(1) と (2) に基づいて、

$$\text{Botanical NESIL} [\mu\text{g}/\text{cm}^2] = \text{EC3} \times 250 \mu\text{g}/\text{cm}^2 / (\text{MDC} / 100) = \text{EC3}/\text{MDC} \times 25000$$

つまり、 $\log(10) \text{ MDC}/\text{EC3}$ と $\text{negative log}(10) \text{ botanical NESIL}$ は同様の分布を示す。

例として、以下の条件の感作性物質 A が含有された植物エキスの botanical NESIL を算出すると、botanical NESIL は、 $5000 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($25 [\mu\text{g}/\text{cm}^2] / (0.5 [\%] / 100)$) と算出可能であった。(つまり、 $5000 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 未満の暴露であれば、植物エキス中の感作性物質 A の暴露量は $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 未満となった。)

[感作性物質 A の条件 (ケーススタディ)]

- EC3 : 0.1% (NESIL : $25 [\mu\text{g}/\text{cm}^2] = 0.1 \times 250$)
- MDC (KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせの検出下限) : 0.5%

解析した 146 の感作性物質においてそれぞれ botanical NESIL を算出し、 $\text{negative log}(10)$ 値を確率分布にプロットした。

確率分布解析

MDC/EC3 比の $\log(10)$ 値および botanical NESIL の $\text{negative log}(10)$ 値を、下記の関係式で定義される正規分布およびガンマ分布にフィッティングした。Botanical DST はフィッティングした分布の 95th percentile 値を基に導出した。

- 正規分布の確率密度関数

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{\left\{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right\}}$$

なお、 μ は分布の平均値であり、 σ は標準偏差を意味する。

- ガンマ分布の確率密度関数

$$f(x) = \frac{1}{\beta^\alpha \Gamma(\alpha)} e^{\left(-\frac{x}{\beta}\right)} x^{\alpha-1}$$

なお、分布の平均値 μ と標準偏差 σ を用いて α と β はそれぞれ μ^2/σ^2 、 σ^2/μ と推定され、 Γ はガンマ関数を意味する。

定量的リスクアセスメント (Quantitative Risk Assessment; QRA)

第1編 第2章 第1節に記載した。

ケーススタディ

Botanical DST アプローチの実用性を評価するためには、具体的な香粧品とその使用状況をふまえた上で botanical DST を製品配合量へと変換する必要がある。本研究では、ケーススタディとしてシャワージェル（全身洗剤）、ハンドソープ、シャンプーおよびヘアコンディショナーについて botanical DST を適用した際の配合可能濃度を算出した。ここで、CEL は Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) から報告されている値を用いた¹⁴⁾。

第2節 結果

1. MDC/EC3 比

解析した146の感作性物質におけるMDC/EC3比の $\log(10)$ 値のヒストグラムをFigure 2-2-2に示す。MDC/EC3比の $\log(10)$ 値が正の値を取った14% (21/146)の物質は、LLNAと比べてKeratinoSens™とh-CLATによる組み合わせによる検出下限が高い物質であった(第2編 第1章)。

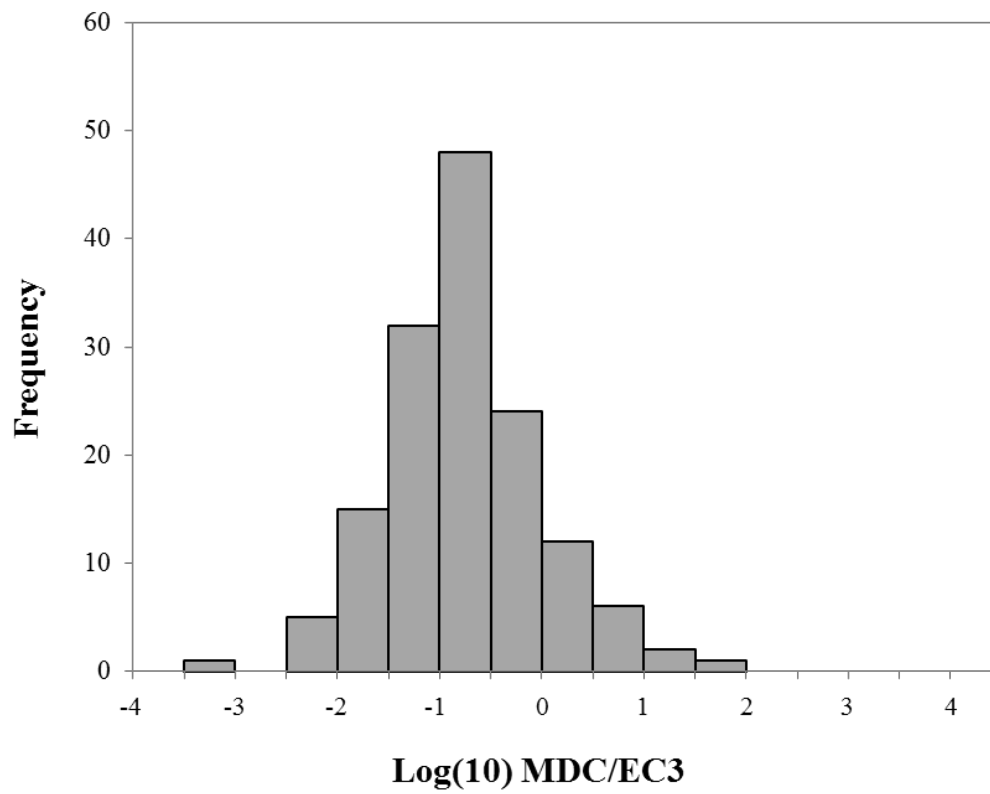


Figure 2-2-2

146 の感作性物質における MDC/EC3 比の log (10) 値のヒストグラム

2. KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせで陰性の植物エキスの DST (Botanical DST)

Negative log (10) botanical NESIL の累積確率分布を Figure 2-2-3 に示す。正規分布 (Figure 2-2-3a) とガンマ分布 (Figure 2-2-3b) とともに、それぞれよくフィットすることが明らかになった。

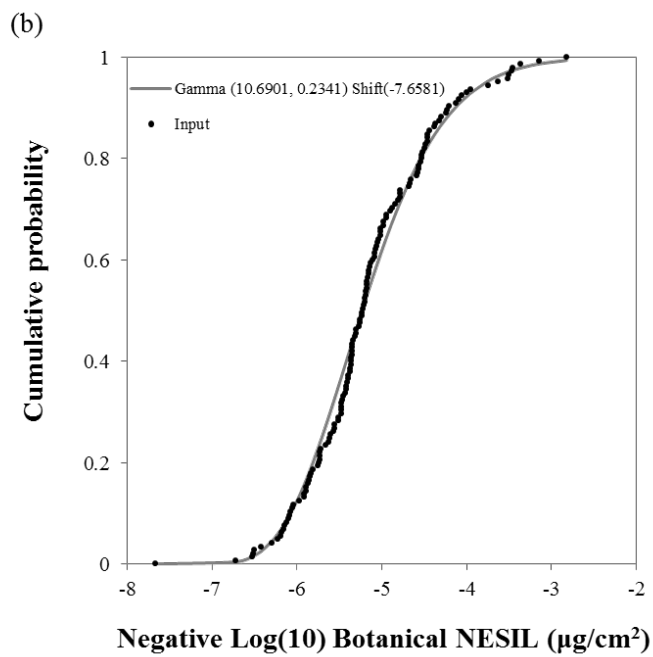
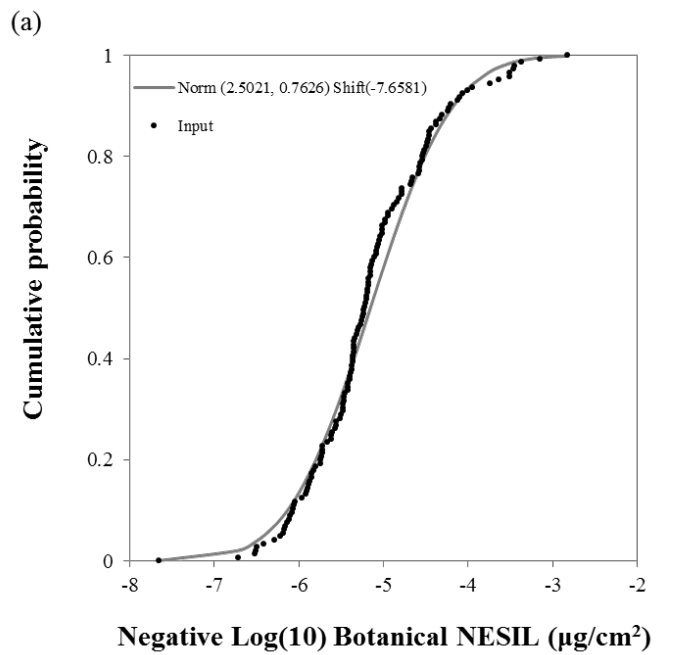


Figure 2-2-3

146 の感作性物質における Negative log (10) botanical NESIL の累積確率分布; (a) 正規分布へのフィッティング (b) ガンマ分布へのフィッティング

Botanical DST を導出するために、フィットした分布から 95th percentile 値を算出した (Table 2-2-1)。

さらに実測データとフィッティングによる理論値を probability plot (特定の分布に対するフィッティング性を視覚的に検証するプロット) を用いて検証した (Figure 2-2-4a および Figure 2-2-5a)。その結果、上端 (低い botanical NESIL) の領域において、ガンマ分布の方が良いフィッティング性を示した (Figure 2-2-4b および Figure 2-2-5b)。したがって、botanical DST の算出にはガンマ分布を用いた。146 の感作性物質における botanical NESIL の 95th percentile 値として $6010 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ と算出されたことから、5%の物質についてはこの値より低い botanical NESIL を有すると予測された。解析した 146 の感作性物質においては、9 物質が $6010 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ より低い botanical NESIL を有した (Table 2-2-2)。さらに、botanical DST アプローチを用いた際の、KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせで陰性であった植物エキスの感作リスクアセスメントフローを Figure 2-2-6 に示す。

Table 2-2-1

Figure 2-2-3 に示した分布から算出した botanical NESIL の 95th percentile 値

	Normal Distribution		Gamma Distribution	
	Negative Log(10) Botanical NESIL [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	Botanical NESIL [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	Negative Log(10) Botanical NESIL [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	Botanical NESIL [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]
95th Percentile	-3.90	7894	-3.78	6010

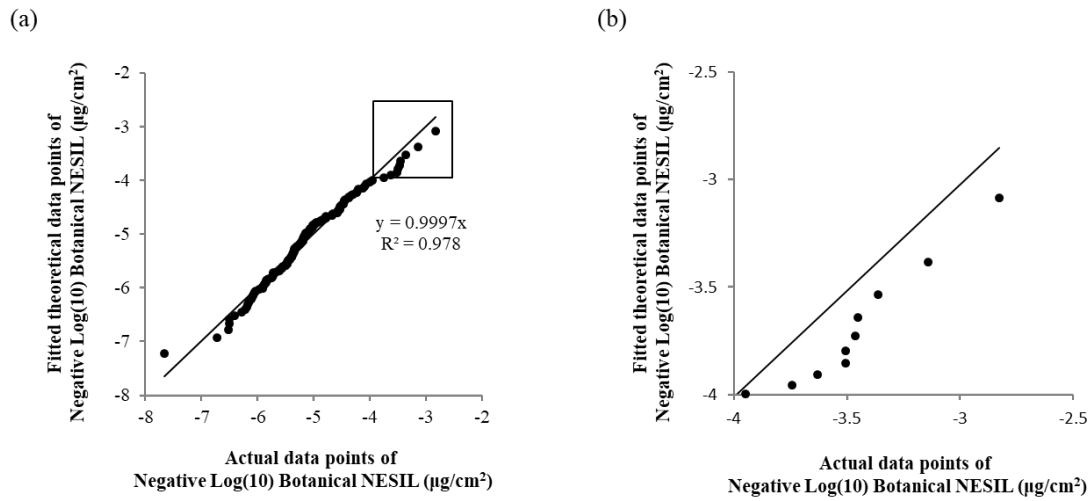


Figure 2-2-4 実測データおよび正規分布へのフィッティングによる理論値の probability plot (a)146 物質の probability plot および線形近似した原点回帰直線 (b) 上端の領域 ((a)における四角で囲んだ領域) における probability plot

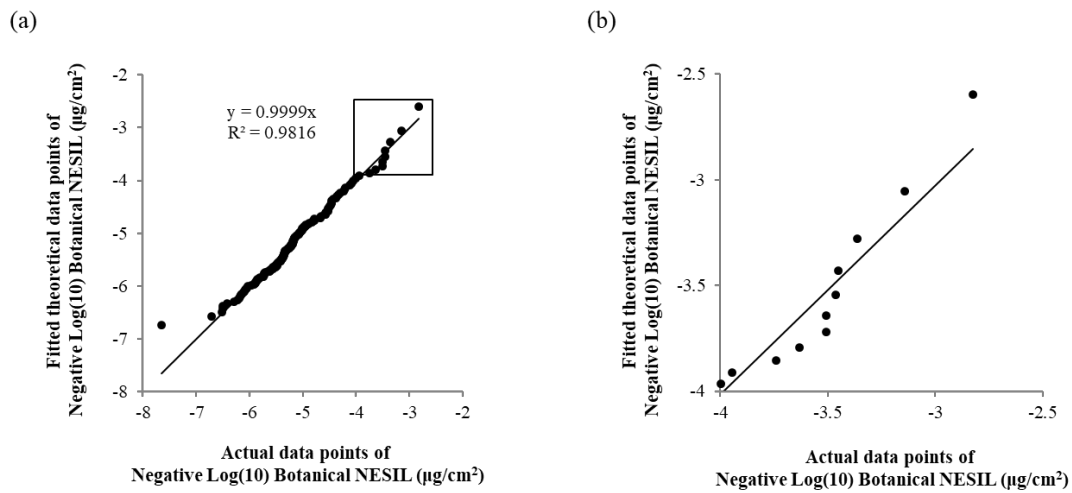


Figure 2-2-5 実測データおよびガンマ分布へのフィッティングによる理論値の probability plot (a)146 物質の probability plot および線形近似した原点回帰直線 (b) 上端の領域 ((a)における四角で囲んだ領域) における probability plot

Table 2-2-2

Figure 2-2-3 に示したガンマ分布から算出した 95th percentile 値より低い botanical NESIL を有する 9 物質

Chemicals	CAS	LLNA EC3 [%]	NESIL [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	Binary test battery MDC [%]	Botanical NESIL [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]
Maleic anhydride	108-31-6	0.16	40	5.97	670
Oxazolone	15646-46-5	0.003	0.75	0.05	1384
Allyl phenoxycetate	7493-74-5	3.1	775	33.5	2313
MCI/MI	26172-55-4 & 2682-20-4	0.005	1.25	0.04	2828
Diphenylcyclopropenone	886-38-4	0.003	0.75	0.03	2909
chloramine T	127-65-1	0.6	150	4.68	3203
2-Methyl-4H,3,1-benzoxazin-4-one	525-76-8	0.7	175	5.44	3217
Hexyl salicylate	6259-76-3	0.18	45	1.05	4267
1,4-Benzquinone	106-51-4	0.0099	2.475	0.04	5525

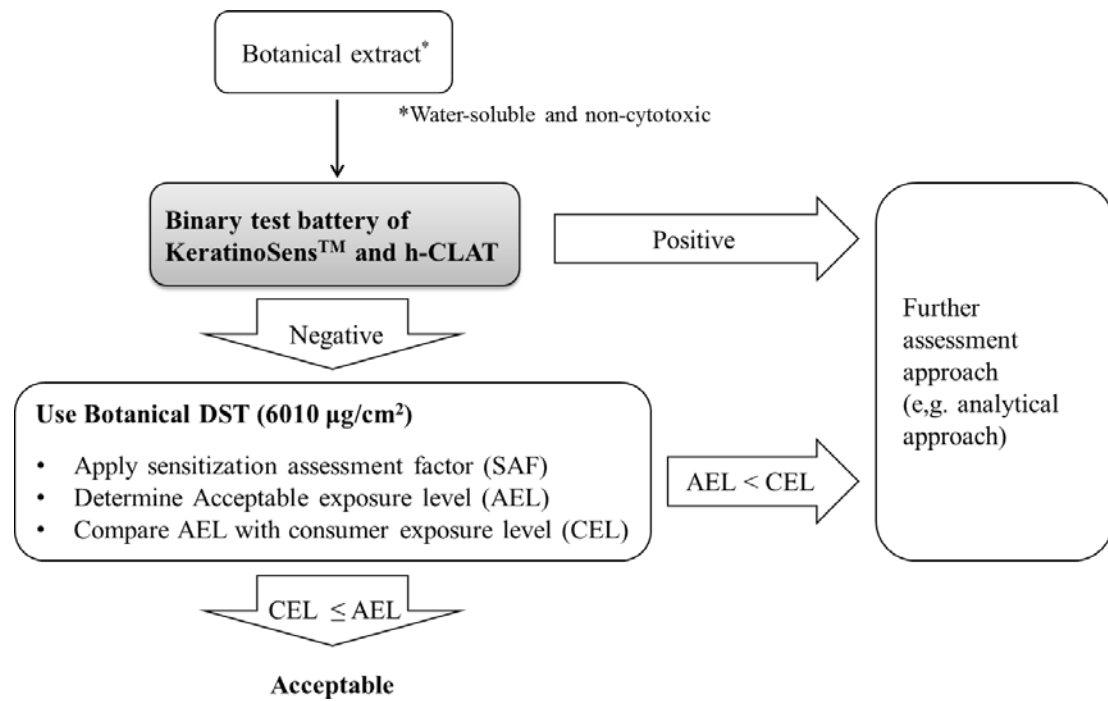


Figure 2-2-6

Botanical DST を用いた植物エキスの感作リスクアセスメントフロー

3. ケーススタディ

シャワージェル

シャワージェルの CEL は、SCCS Notes of Guidance 9th revision に基づいて 0.011 mg/cm²/day を用いた。また、シャワージェルは SAF=100 であると考えて、KeratinoSensTM と h-CLAT による組み合わせで陰性となった植物エキスの許容暴露量 (botanical AEL) を 60.1 µg/cm² (= 6010/100) と算出した¹⁰⁾。このことから、KeratinoSensTM と h-CLAT で共に陰性の植物エキスの配合可能濃度は >100% (= 60.1 / (0.011 x 1000)) と算出された (Table 2-2-3)。

ハンドソープ

ハンドソープの CEL は、SCCS Notes of Guidance 9th revision に基づいて 0.23 mg/cm²/day を用いた。また、ハンドソープは SAF=100 であると考えて、botanical AEL を 60.1 µg/cm² (= 6010/100) と算出した¹⁰⁾。このことから、KeratinoSensTM と h-CLAT で共に陰性の植物エキスの配合可能濃度は 25.8% (= 60.1 / (0.23 x 1000)) と算出された (Table 2-2-3)。

シャンプー

シャンプーの CEL は、SCCS Notes of Guidance 9th revision に基づいて 0.073 mg/cm²/day を用いた。また、シャンプーは SAF=100 であると考えて、botanical AEL を 60.1 µg/cm² (= 6010/100) と算出した¹⁰⁾。このことから、KeratinoSensTM と h-CLAT で共に陰性の植物エキスの配合可能濃度は 82.7% (= 60.1 / (0.073 x 1000)) と算出された (Table 2-2-3)。

ヘアコンディショナー

ヘアコンディショナーの CEL は、SCCS Notes of Guidance 9th revision に基づいて 0.027 mg/cm²/day を用いた。また、ヘアコンディショナーは SAF=100 であると考えて、botanical AEL を 60.1 µg/cm² (= 6010/100) と算出した¹⁰⁾。このことから、KeratinoSensTM と h-CLAT で共に陰性の植物エキスの配合可能濃度は >100% (= 60.1 / (0.027 x 1000)) と算出された (Table 2-2-3)。

Table 2-2-3

代表的な製品カテゴリーについて Botanical DST を適用した際の配合可能濃度

Product type	Estimated daily amount applied [g]	Retention factor	Calculated daily exposure [g/day]	Skin surface area involved Surface area [cm ²]	Parameters (if specified)	CEL [mg/cm ² /day]	SAF	Botanical AEL	Acceptable formulation ratio in product [%]
Shower gel	18.67	0.01	0.19	17500	total body area	0.011	100	60.1	>100
Hand wash soap	20.00	0.01	0.20	860	area hands	0.233	100	60.1	25.8
Shampoo	10.46	0.01	0.10	1440	area hands + 1/2 area head	0.07	100	60.1	82.7
Hair conditioner	3.92	0.01	0.04	1440	area hands + 1/2 area head	0.027	100	60.1	>100

第3節 考察

これまで、植物エキスの動物を用いない皮膚感作リスクアセスメントとしては、機器分析を用いたアセスメント手法が主流であった⁴⁹⁾。しかし、複雑な混合物である植物エキス中の感作性物質を non-target の網羅分析から定性・定量することは多くの時間を要し、困難である。そこで本研究では、*in vitro* 試験法を用いた感作リスクアセスメント戦略の構築を試みた。第2編 第1章の検討から、植物エキス中に含まれる感作性物質を検出する手法として、KeratinoSens™と h-CLAT の組み合わせが LLNA と比べて高い検出感度を有することを明らかにした。しかし、一部の感作性物質については、LLNA と比べて *in vitro* 試験法の検出下限の方が高いことも明らかになった。動物を用いずに商物エキスの感作リスクアセスメントの評価を行うには、これら LLNA と比べて *in vitro* 試験法の検出下限の方が高い感作性物質が植物エキス中に含まれる懸念を考慮する必要がある。そこで本研究では、確率論的アプローチを組み合わせ、KeratinoSens™と h-CLAT で評価した植物エキスのリスクアセスメント戦略を構築した。*In vitro* 試験法で評価した植物エキスについては、仮に *in vitro* 試験法で陰性であったとしても、このような感作性物質が植物エキス中に検出下限未満で含有されているリスクも考慮する必要がある。感作性物質にはそれぞれ固有の NESIL が存在する⁵³⁾。そこで、植物エキスに含まれる感作性物質の濃度が予想できれば、植物エキス中の感作性物質がその NESIL を超えないような植物エキスの暴露量を算出できることに着目した。植物エキスが *in vitro* 試験法で陰性であれば、仮に感作性物質が含まれていたとしてもその濃度は *in vitro* 試験法の検出下限未満であると予想でき、植物エキスの NESIL (botanical NESIL) を算出できる (Figure 2-2-1)。この方法で、植物エキス中に未同定の感作性物質が含まれていたとしても、botanical NESIL を算出することができた。また、植物エキスが水溶性で、かつ細胞毒性を生じないこと、感作性物質の検出下限が植物エキス中の他成分からマスキング・ブースティングなどの影響を受けないことという、3つの仮定を前提に検証を行った。そこで感作性物質 146 物質を解析対象として、それらが植物エキス中に含有されていた際の botanical NESIL の 95th percentile 値を基に、*in vitro* 試験法で陰性となった植物エキスの DST (botanical DST) として 6010 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ を導いた。

Botanical DST は、評価した植物エキス全体が感作を誘導するリスクが低い暴露量閾値として設定された値である。そのため、この値は植物エキス中の各成分に適用することはできず、これは各成分に適用しリスクアセスメントを行う TTC や DST のアプローチと異なる点である。一方、botanical NESIL は KeratinoSens™と h-CLAT の組み合わせで陰性となった植物エキスに適用することができる (Figure 2-2-1)。これも、化学構造情報を基に Non-reactive DST 900 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、Reactive DST 64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ をそれぞれ用いる DST とは異なる点である。一方で、botanical DST は仮に植物エキス中に含まれる成分の感作性情報が不明であったとしても、KeratinoSens™と h-CLAT の組み合わせで陰性であれ

ば、その植物エキス全体に適用することができる。このことから、**botanical DST** アプローチは *in vitro* 試験法から得られた情報を組み入れた新規のリスクアセスメント戦略であるといえた。

本研究のケーススタディから、**botanical DST** アプローチを用いることで、**KeratinoSens™**と **h-CLAT** で陰性の植物エキスをリンスオフ製品に配合しても、大きな感作リスクを生じないことが示唆された (Table 2-2-2)。これらのことから、**botanical DST** アプローチが様々な製品において実用可能なアプローチであることが示された。今後、**botanical DST** を上回る暴露量が想定される場合には、*in vitro* 試験に加えて **non-target** 分析などの追加のアプローチを用いることで複雑な混合物中に感作性物質が含まれていないか解析する必要がある。追加のアプローチにより含有成分の化学構造が明らかになれば、個々の成分に対して **reactive DST** や **non-reactive DST** を適用するアプローチを適用することが可能である¹⁶⁾。

天然由来の植物エキス中の成分は多様であるのに対して、本研究の解析で用いた感作性物質は限定的であったため、その不確実性が存損したことは考慮される必要がある。また、**botanical DST** の導出においては確率論的なアプローチを用いており、すべての感作性物質について担保するものではないことも考慮される必要がある。この点は **TTC** や **DST** においても同様である。**botanical DST** は **95th percentile** 値に基づいて算出されており、残りの 5%については感作を誘導する可能性が残った。過去の検討から、**European List of Notified Chemical Substances** のデータベースにおいて、感作性物質は世の中の物質のうち約 20%であることが示された¹⁵⁾。この 20%という値は、**Annex I of Directive 67/548 EEC**、**European Flavour and Fragrance Association** および **IFRA/RIFM dataset of fragrance ingredients** のデータベースにおいても、同等であり妥当性が示された⁵⁵⁾。感作性物質は世の中の物質のうち約 20%であることをふまえ、世の中の化学物質全体における **95th percentile** 値を閾値として設定するために、**DST** においては解析した感作性物質の **75th percentile** 値を用いており、感作性物質の 25%については感作を誘導する懸念が残る値として設定された ($1 - (0.20 \times 0.25) = 0.95$)¹⁵⁾。それに対し、本研究では、感作性物質から算出した **botanical NESIL** の **95th percentile** 値を用いて **botanical DST** を導出した。これは、世の中の化学物質全体に対しては **99th percentile** 値に相当し ($1 - 0.2 \times (1 - 0.95) = 0.99$)、世の中の化学物質全体における **95th percentile** 値とした **DST** よりも保守的な確率を採用しているといえる。しかしながら、本研究で解析した 146 の感作性物質のうち、9 物質が **6010 µg/cm²** よりも低い **botanical NESIL** を有した (Table 3)。Hexyl salicylate については **HRIPT**、**HMT** の結果 (**HRIPT** で **35,433 µg/cm²** で反応なし、**HMT** で **20,654 µg/cm²** で反応なし) から **LLNA** で偽陽性の可能性があるとして報告されている²⁵⁾。そのため、仮に植物エキス中に含有されたとしても、皮膚感作性を生じる可能性は低いと考えられた。また、**maleic anhydride** については無水物であるため、植物エキスを製造する際の水系を含む様々な抽出過程や化粧品へ配合する過程で加水分解され、実際上

皮膚感作性のない物質へと変化する可能性が推察できた。Hexyl salicylate と maleic anhydride の 2 品を除いた 7 物質については、皮膚感作性を誘導する可能性が残る。しかし、ここで考慮すべきは、これらの物質については化学構造から考えて、天然由来の植物エキスに含まれることは考えにくいという点である。

LLNA の妥当性検証として、Hoffmann らは複数の実験で得られた結果のバラツキに関して検証を行っている⁵⁶⁾。この研究では、LLNA の結果を参照する際にはそのバラツキを考慮する重要性が示されている。一方で、本研究では NESIL、EC3、EC1.5 および MIT のバラツキについては特に考慮をせずに、植物エキス中の微量成分のリスクアセスメントに向けた、確率論的なアプローチを用いた原理証明 (a proof of principle) の研究として解析を行った。したがって、EC3、EC1.5 および MIT のバラツキについては今後さらなる検証が必要である。さらに本研究では、特にマウスからヒトへの変換係数などの考慮は行わなかった。これは既報の DST アプローチと同様のアプローチである^{15, 16)}。この点については、最近、データセットにおけるマウスとヒトの差の 95th percentile を採用し、マウスとヒトの種差を保守的に考慮した評価係数 15 が提案された⁵⁷⁾。一方で、LLNA の結果がヒトの感作誘導濃度と高い相関を示すことから、マウスとヒトの種差を考慮する必要性については議論がなされているところである⁵⁸⁾。ヒトに比べ LLNA で過大/過小評価してしまう物質の特性や、評価物質の性状等をふまえて、マウスとヒトの種差をケースバイケースで考慮する必要性も提案されており⁵⁹⁾、より精緻な閾値設定にはさらなる検証が必要であろう。最後に、botanical DST は感作誘導のリスクを担保する値であり、惹起のリスクを担保するものではないことも考慮する必要がある。一般的に感作濃度よりも惹起濃度の方が低いことが知られており、注意が必要である。

第4節 小括

本章の目的は、動物を用いない植物エキスの感作リスクアセスメントの実現であった。本章では代替法によるハザード評価に加えて、暴露量の観点からアプローチすることで、感作リスクアセスメントを行うことを試みた。本研究では、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に含まれる感作性物質について、その植物エキス中の最大含有濃度が予想できる点であった。感作性試験で陰性であれば、仮に感作性物質が含まれていたとしても、その濃度は感作性試験の検出下限未満である。つまり、LLNA と比べて代替法の検出下限の方が高い感作性物質が植物エキス中に存在するとしても、代替法で陰性となった植物エキに含まれる感作性物質の濃度は、その検出下限未満であると予想できた。2点目は、感作性の誘導には閾値が存在し、No Expected Sensitization Induction Level (NESIL) が存在する点であった。これら2点から、代替法で陰性となった植物エキスの NESIL (botanical NESIL) を算出した。このことから、植物エキスが代替法で陰性となった場合、その植物エキに含まれる感作性物質が含有している場合でも暴露量をコントロールすることで、リスクアセスメントできることが示された。

評価した植物エキス中に 146 品の感作性物質が含有され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、KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせで陰性となった植物エキスの DST (botanical DST) を 6010 µg/cm² と算出した。

その上でケーススタディとして、シャワージェル (全身洗剤)、ハンドソープ、シャンプーおよびヘアコンディショナーといったリンスオフ製品について、botanical DST を適用した際の配合可能濃度を算出した。その結果、botanical DST アプローチを用いることで、KeratinoSens™ と h-CLAT で陰性の植物エキスをリーブオン製品に数 0.1% (as is) レベル、リンスオフ製品に数% (as is) レベルで配合されても、大きな感作リスクを生じない可能性が示唆された (Table 2-2-3)。

結語

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と、複雑な混合物である植物エキス中の感作性物質それぞれに対して、動物を用いない評価法の適用性を研究することで、さまざまな香粧品原料を網羅的に評価できる動物を用いない評価技術の構築を目指した。

第1編では、まず第1章において DPRA、KeratinoSens™、および h-CLAT の組み合わせによる高感度なハザード検出について検討を行った。KeratinoSens™、および h-CLAT のデータを有する 203 物質のデータセットにおいて LLNA に対するこれら *in vitro* 試験法の予測性を検証した結果、LLNA で陽性となった物質に対して KeratinoSens™ と h-CLAT の組み合わせは 93.4% の感度を示した (Table 1-1-2)。また、ヒトデータが入手可能であった 97 物質においても予測性を検証した結果、KeratinoSens™ と h-CLAT の組み合わせは 94.4% の感度を示した (Table 1-1-2)。その中で、LogKow >3.5 の難水溶性の物質については、KeratinoSens™ と h-CLAT の組み合わせや 3 out of 3 ITS の結果のみで非感作性物質と断定することはできず、KeratinoSens™ と h-CLAT の組み合わせと 3 out of 3 ITS に共通した予測性の限界も示唆された。一方で、pre-/pro-hapten やアシル転移誘導物質 (またはアミン反応性物質) などの予測性限界となる性質については、KeratinoSens™ と h-CLAT の組み合わせは 3 out of 3 ITS と比べて同等以上であった。したがって、KeratinoSens™ と h-CLAT の組み合わせは、皮膚感作性のハザード予測において、被験物質を非感作性物質であることを判断するボトムアップアプローチとして有用であるといえた (第1編 第1章 第5節)。

さらに第2章では、BN ITS-3 を用いた感作強度予測と、予測された感作強度に基づいた定量的リスクアセスメントの実現を目的に、その予測性の検証を行った。BN ITS-3 の感作強度予測性を本編 第1章で用いた 203 物質のデータセットを用いて検証し、大きく (2 分類の差をもって) 過小評価する物質がアシル転移誘導物質、アミン反応性物質、LogKow >3.5 の難水溶性の物質、pre-/pro-hapten という予測性限界とされ得る性質を有していることを明らかにした (Table 1-2-2)。その上で、これら予測性限界に該当した 81 物質を除いた 94 物質の BN ITS-3 の予測性を検証したところ、4 つの強度分類の全体の予測性は 71.2% (67/94) であった (Table 1-2-3)。Strong/extreme、moderate、weak および非感作性物質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) であった。一方、20.6% (14/68) の感作性物質については過小評価となったが、過小評価されたとしても 1 分類の違いの範囲であった (Table 1-2-3)。その上で、BN ITS-3 による過小評価の可能性を最小化するために、本研究では予測結果が過小評価される程度を考慮し、新たに感作強度分類を定義した (Figure 1-2-1)。

第2編では、複雑な混合物である植物エキス中の感作性物質の評価に向けた動物を用いない評価技術の適用性検証を実践に関する研究を行った。香粧品原料の中には、植物

エキスなど天然由来の混合物が多く存在し、それらの一部には感作性物質が含まれる可能性がある。しかしながら代替法において、混合物中の感作性物質に対する検出力は明確になっていなかった。そこで第1章では、植物エキス中の感作性物質に対する動物試験代替の可能性を検証すべく、感作性物質以外の成分が検出下限に影響を与えないことを前提に、感作性物質の検出濃度について *in vitro* 試験法 (h-CLAT と KeratinoSens™) と LLNA の比較を行った。植物エキスなどの混合物の評価に適用可能である *in vitro* 試験法である h-CLAT と KeratinoSens™、および *in vivo* 試験法である LLNA のデータが存在する感作性物質 146 品を解析対象とし、各感作性物質について、LLNA での検出濃度 (EC3) と代替法での検出濃度 (MDC) を比較した (Figure 2-1-1)。その結果、感作性物質の 86% (146 物質中 125 物質) について、LLNA に比べ KeratinoSens™ と h-CLAT の組み合わせの方が低濃度で検出できることが明らかになった (Table 2-1-2)。一方で、14% (146 物質中 21 物質) の感作性物質については、LLNA と比べて KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせの検出下限の方が高かった (Table 2-1-2)。以上より、KeratinoSens™ と h-CLAT の組み合わせを用いることで、植物エキス中の感作性物質を LLNA と同等以上の検出感度で評価できる可能性が示された。しかし、仮に植物エキス中に LLNA と比べて KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせの検出下限の方が高い感作性物質が含まれ、含有濃度が LLNA の検出下限以上、KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせの検出下限未満である場合、LLNA で陽性となる植物エキスを KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせによって偽陰性判定する可能性が示された。*In vitro* 試験で評価した植物エキスを化粧品に配合する際には、このような LLNA と比べて KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせの検出下限の方が高い感作性物質が植物エキス中に含有されているリスクを考慮する必要がある。

そこで第2章では、KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせによるハザード評価に加えて、暴露量の観点からアプローチすることで、感作リスクアセスメントを行うことを試みた。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る。植物エキスが感作性試験で陽性と判定されるということは、評価した植物エキス中に感作性物質が検出下限以上で含まれていることを意味する。言い換えれば、感作性試験で陰性であれば、仮に感作性物質が含まれていたとしても、その濃度は感作性試験の検出下限未満である。つまり、LLNA と比べて KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせの検出下限の方が高い感作性物質が植物エキス中に存在するとしても、KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせで陰性となった植物エキスに含まれる感作性物質の濃度は、その検出下限未満であると予想できた。2点目は、感作性の誘導には閾値が存在し、NESIL が存在する点である¹⁰⁾。植物エキス中の感作性物質の最大含有濃度と NESIL という2点を考慮し、KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせで陰性となった植物エキスの NESIL (botanical NESIL) を、評価した植物エキス中に 146 品の感作性物質が含

有されていたという想定のもとで算出した (Figure 2-2-1)。このことから、植物エキスが代替法で陰性となった場合、その植物エキスに感作性物質が含有している場合でも暴露量をコントロールすることで、リスクアセスメントできることが示された。そして、botanical NESIL の 95th percentile 値を算出することで、KeratinoSens™ と h-CLAT による組み合わせで陰性となった植物エキスの DST (botanical DST) を 6010 µg/cm² として算出した (Table 2-2-1)。

以上より、化学構造既知の原料の評価に向けて高純度単一物質と、複雑な混合物である植物エキス中の感作性物質それぞれに対する動物を用いない皮膚感作性評価技術の適用性検証を実践に関する研究を行うことで、さまざまな香粧品原料を網羅的に評価できる技術の構築を行った。本成果は、倫理上・法規制上の観点から近年強く求められている香粧品原料の動物を用いない評価の実現と精緻化に大きく寄与するものとする。

引用文献

1. Magnusson, B., Kligman AM., (1969) The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatol.*, 52, 268-276.
2. Basketter, D.A., Evans, P., Fielder, R.J., Gerberick, G.F., Dearman, R.J., Kimber, I. (2002) . Local lymph node assay - Validation, conduct and use in practice. *Food Chem. Toxicol.*, 40, 593-598.
3. 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. [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2012\)10/part1&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)10/part1&doclanguage=en)
4. Gerberick, G. F., Vassallo, J. D., Bailey, R. E., Chaney, J. G., Morrall, S.W., and Lepoittevin, J.P. (2004) . Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol. Sci.*, 81, 332-343.
5. Gerberick, G.F., Vassallo, J.D., Foertsch, L.M., Price, B.B., Chaney, J.G., Lepoittevin, J.P. (2007) . Quantification of Chemical Peptide Reactivity for Screening Contact Allergens: A Classification Tree Model Approach. *Toxicol. Sci.*, 97, 417-427.
6. Emter, R., Ellis, G., Natsch, A. (2010) . Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 245, 281-290.
7. Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Kosaka, N., Ishikawa, M., Nukada, Y., Miyazawa, M., Ito, Y., Nishiyama, N., Itagaki, H. (2010) . A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA) . *Altern. Lab. Anim.*, 38, 275-84.
8. OECD. (2005) . health and publication series on testing and assessment No.34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment.

[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2005\)14&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2005)14&doclanguage=en)

9. 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. [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mon\(2016\)29&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mon(2016)29&doclanguage=en)
10. Api, A.M., Basketter, D.A., Cadby, P.A., Cano, M.-F., Ellis, G., Gerberick, G.F., Griem, P., McNamee, P.M., Ryan, C.A., Safford, R. (2008) . Dermal sensitization quantitative risk assessment (QRA) for fragrance ingredients. Regul. Toxicol. Pharmacol., 52, 3-23.
11. Safford, R.J., Aptula, A.O., Gilmour, N. (2011) . Refinement of the Dermal Sensitisation Threshold (DST) approach using a larger dataset and incorporating mechanistic chemistry domains. Regul. Toxicol. Pharmacol., 60, 218-224.
12. Felter, S.P., Robinson, M.K., Basketter, D.A., Gerberick, G.F. (2002) . A review of the scientific basis for uncertainty factors for use in quantitative risk assessment for the induction of allergic contact dermatitis. Contact Dermatitis., 47, 257-266
13. Felter, S.P., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Gilmour, N.J., Gerberick, G.F. (2003) . Application of the risk assessment paradigm to the induction of allergic contact dermatitis. Regul Toxicol Pharmacol., 37, 1-10
14. Scientific Committee on Consumer Safety (2018) . The SCCS notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation 10th revision. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_224.pdf
15. Safford, R.J. (2008) . The Dermal Sensitisation Threshold-A TTC approach for allergic contact dermatitis. Regul. Toxicol. Pharmacol., 51, 195-200.
16. Safford, R.J., Api, A.M., Roberts, D.W., Lalko, J.F. (2015) . Extension of the Dermal

Sensitisation Threshold (DST) approach to incorporate chemicals classified as reactive. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 72, 694-701.

17. Rulis A.M., (1986) ., De minimis and the threshold of regulation. In:Felix CW (ed) *Food protection technology*. Lewis Publishers, Chelsea, 29-37.
18. Roberts, D.W., Api, A.M., Safford, R.J., Lalko, J.F. (2015) . Principles for identification of High Potency Category Chemicals for which the Dermal Sensitisation Threshold (DST) approach should not be applied. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 72, 683-693.
19. Goebel, C., Aeby, P., Ade, N., Alépée, N., Aptula, A., Araki, D., Dufour, E., Gilmour, N., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Kirst, A., Marrec-Fairley, M., Maxwell, G., Rowland, J., Safford, B., Schellauf, F., Schepky, A., Seaman, C., Teichert, T., Tessier, N., Teissier, S., Weltzien, H.U., Winkler, P., Scheel, J. (2012) . Guiding principles for the implementation of non-animal safety assessment approaches for cosmetics: skin sensitization. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 63, 40-52.
20. Kiken, D.A., Cohen, D.E. (2002) . Contact dermatitis to botanical extracts. *Am J Contact Dermat.*, 13, 148-152
21. Lalko, J, Api, A.M. (2006) . Investigation of the dermal sensitization potential of various essential oils in the local lymph node assay. *Food Chem Toxicol.*, 44, 739-746
22. Bauch, C., Kolle, S.N., Ramirez, T., Eltze, T., Fabian, E., Mehling, A., Teubner, W., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R., (2012) . Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 63, 489-504.
23. Natsch, A., Ryan, C.A., Foertsch, L., Emter, R., Jaworska, J., Gerberick, F., Kern, P., (2013) . A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *J. Appl. Toxicol.*, 33, 1337-1352.
24. van der Veen, J.W., Rorije, E., Emter, R., Natsch, A., van, L.H., Ezendam, J., (2014) . Evaluating the performance of integrated approaches for hazard

- identification of skin sensitizing chemicals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 69, 371-379.
25. Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa M., Sakaguchi, H., (2015) . Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 71, 337–351.
 26. Natsch, A., Emter, R. (2016) . Nrf2 activation as a key event triggered by skin sensitizers: The development of the stable KeratinoSens reporter gene assay. *Altern. Lab. Anim.*, 44, 443-451.
 27. Megherbi, R., Kiorpelidou, E., Foster, B., Rowe, C., Naisbitt, D.J., Goldring, C.E., Park, B.K. (2009) . Role of protein haptentation in triggering maturation events in the dendritic cell surrogate cell line THP-1. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 120-132.
 28. Guedes, S., Neves, B., Vitorino, R., Domingues, R., Cruz, M.T., Domingues, P. (2017) . Contact dermatitis: in pursuit of sensitizer's molecular targets through proteomics. *Arch. Toxicol.*, 91, 811-825.
 29. Takenouchi, O., Fukui, S., Okamoto, K., Kurotani, S., Imai, N., Fujishiro, M., Kyotani, D., Kato, Y., Kasahara, T., Fujita, M., Toyoda, A., Sekiya, D., Watanabe, S., Seto, H., Hirota, M., Ashikaga, T., Miyazawa, M., (2015) . Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J. Appl. Toxicol.*, 35, 1318-1332.
 30. Jaworska, J.S., Natsch, A., Ryan, C., Strickland, J., Ashikaga, T., Miyazawa, M., (2015) . Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch. Toxicol.*, 89, 2355-2383.
 31. OECD. (2015) . OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) . http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation_9789264229709-en

32. OECD. (2015) . OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 442D: In vitro Skin Sensitization: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442d-in-vitro-skin-sensitisation_9789264229822-en
33. Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., Tagami, H. (1997) . Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol.*, 27, 3031-3038.
34. OECD. (2016) . OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 442E: In vitro Skin Sensitization: human Cell Line Activation Test (h-CLAT) . http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-invitro-skin-sensitisation_9789264264359-en
35. Cooper, J.A.2nd, Saracci, R, Cole, P. (1979) . Describing the validity of carcinogen screening tests. *Br J Cancer.*, 39, 87-89
36. Dearman, R., Basketter, D., Kimber, I., (2013) . Inter-relationships between different classes of chemical allergens. *J. Appl. Toxicol.*, 33, 558-565.
37. Saito, K., Takenouchi, O., Nukada, Y., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2016) . An in vitro skin sensitization assay termed EpiSensA for broad sets of chemicals including lipophilic chemicals and pre/pro-haptens. *Toxicol. In vitro.*, 40, 11-25.
38. Patlewicz, G., Casati, S., Basketter, D.A., Asturiol, D., Roberts, D.W., Lepoittevin, J.P., Worth, A.P., Aschberger, K. (2016) . Can currently available non-animal methods detect pre and pro-haptens relevant for skin sensitization? *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 82, 147-155.
39. Aptula, A.O., Patlewicz, G., Roberts, D.W. (2005) . Skin sensitization: reaction mechanistic applicability domains for structure-activity relationships. *Chem. Res. Toxicol.*, 18, 1420-1426.
40. Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015) . The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS)

addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In vitro.* 29, 901-16.

41. Wurm, F., Dingels, C., Frey, H., Klok, H.A. (2012). Squaric acid mediated synthesis and biological activity of a library of linear and hyperbranched poly (glycerol) -protein conjugates. *Biomacromolecules.* 13, 1161-71.
42. Pocker, Y., Meany, J.E., Jones, R.C. (1982). Hydration and hydrolysis of methyl pyruvate. A bifunctional probe of chemical and enzymatic catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4885-4889.
43. EURL ECVAM. (2013). Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/news/news_docs/h-clat-validation-study-report
44. Natsch, A., Gfeller, H., (2008). LC-MS-based characterization of the peptide reactivity of chemicals to improve the in vitro prediction of the skin sensitization potential. *Toxicol. Sci.*, 106, 464-478.
45. Hirota, M., Fukui, S., Okamoto, K., Kurotani, S., Imai, N., Fujishiro, M., Kyotani, D., Kato, Y., Kasahara, T., Fujita, M., Toyoda, A., Sekiya, D., Watanabe, S., Seto, H., Takenouchi, O., Ashikaga, T., Miyazawa, M. (2015). Evaluation of combinations of in vitro sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J. Appl. Toxicol.*, 35, 1333-47.
46. Strickland, J., Zang, Q., Kleinstreuer, N., Paris, M., Lehmann, D. M., Choksi, N., Matheson, J., Jacobs, A., Lowit, A., Allen, D., Casey, W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J. Appl. Toxicol.*, 36, 1150-1162.
47. Nukada, Y., Miyazawa, M., Saito, K., Sakaguchi, H., Nishiyama, N. (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Toxicol In Vitro.*, 27, 609-618
48. Natsch, A., Emter, R., Gfeller, H., Haupt, T., Ellis, G. (2015). Predicting skin sensitizer potency based on in vitro data from KeratinoSens and kinetics peptide

binding: global versus domain-based assessment. *Toxicol. Sci.*, 143, 319-332

49. Koster, S., Leeman, W., Verheij, E., Dutman E., Stee, L.V., Nielsen, L.M., Ronsmans, S., Noteborn, H., Krul, L. (2015) . A novel safety assessment strategy applied to non-selective extracts. *Food Chem. Toxicol.*, 80, 163-181.
50. Antignac, E., Nohynek, G.J., Re, T., Clouzeau, J., Toutain, H. (2011) . Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics. *Food. Chem. Toxicol.*, 49, 324-341.
51. Andres, E., Sa-Rocha, V.M., Barrichello., C., Haupt, T., Ellis, G., Natsch, A. (2013) . The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: a pilot study. *Toxicol In Vitro*, 27, 1220-1225
52. Kern, P.S., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kimber, I., Aptula, A., Basketter, D.A. (2010) . Local lymph node data for the evaluation of skin sensitization alternatives: a second compilation. *Dermatitis*, 21, 8-32
53. Kimber I, Dearman RJ, Basketter DA, Ryan CA, Gerberick GF, McNamee PM, Lalko J, Api AM. (2008) . Dose metrics in the acquisition of skin sensitization: thresholds and importance of dose per unit area. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 52, 39-45.
54. Basketter DA, Clapp C, Jefferies D, Safford B, Ryan CA, Gerberick F, Dearman RJ, Kimber I. (2005) . Predictive identification of human skin sensitization thresholds. *Contact Dermatitis.*, 53, 260-207.
55. Keller, D., Krauledat, M., Scheel, J. (2009) . Feasibility study to support a threshold of sensitization concern concept in risk assessment based on human data. *Arch. Toxicol.*, 89, 2355-2383
56. Hoffman, S. (2015) . LLNA variability: an essential ingredient for a comprehensive assessment of non-animal skin sensitization test methods and strategies. *ALTEX*, 32, 379-383
57. Bil W, Schuur AG, Ezendam J, Bokkers BGH. (2017) . Probabilistic derivation of

the interspecies assessment factor for skin sensitization. Regul Toxicol Pharmacol., 88, 34-44

58. Basketter DA, Natsch A, Ellis G, Api AM, Irizar A, Safford B, Ryan C, Kern P. (2018) Interspecies assessment factors and skin sensitization risk assessment. Regul. Toxicol. Pharmacol., 186-188.
59. Roberts DW, Api AM. (2018) . Chemical applicability domain of the local lymph node assay (LLNA) for skin sensitisation potency. Part 4. Quantitative correlation of LLNA potency with human potency. Regul Toxicol Pharmacol., 96, 76-84.

謝辞

本章を遂行し、まとめるにあたって、実に多くの方にお世話になりました。この場を借りて、感謝の意を述べさせて頂きたいと思います。

本論文の審査における主査をお引き受けくださり、その審査の過程で御指導を賜りました城西大学 機能性食品科学講座教授 古旗 賢二先生に衷心より深甚なる謝意を表します。また、本論文の審査における副査をお引き受けくださり、その審査の過程で御指導を賜りました城西大学 臨床薬理学講座教授 木村 光利先生、生体分析化学講座教授 古地 壯光先生に衷心より深甚なる謝意を表します。

本論文の作成に際して貴重な御指導を賜りました城西大学 薬粧品動態制御学講座教授 杉林 堅次先生、同准教授 藤堂 浩明先生に衷心より深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、終始有益な御指導、御助言を賜りました花王株式会社 安全性科学研究所 宮澤 正明博士に心から感謝を申し上げます。投稿論文の執筆や学会発表、日頃の研究内容に渡って、手厚いご指導を頂きました。本論文を執筆することができたのも、宮澤博士の日頃の御指導・御助言のお陰に他なりません。また、同研究所 坂口 斉博士には、日頃より多くの御助言や御支援を頂きました。深く感謝申し上げます。

さらに研究の遂行にあたり、多大なご協力、ご支援を頂いた同研究所 大坪 裕紀氏に心から感謝の意を表します。本論文が完成したのも大坪氏が一緒に研究を進め、多くの成果を見出して下さったお陰です。深く感謝申し上げます。そして、同研究所 齋藤 和智博士には、研究の進め方や悩みについて親身になって相談に乗って頂き、様々な御助言をいただきました。深くお礼申し上げます。また、同研究所 水町 秀之博士には、有益な御意見、御支援を頂きましたこと、感謝しております。

最後に、本論文をまとめるにあたり、これまで私を温かく見守ってくれた両親、そして、常に明るく励まし続け、応援してくれると共に時間を与えてくれた妻 歩と娘たち 紡、詩に心から謝意を記します。

以上の皆様の御助言、御支援、御協力、励ましに対し、深く感謝申し上げます。