

医薬薬審発 0328 第 2 号
令和 7 年 3 月 28 日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬局医薬品審査管理課長
（ 公 印 省 略 ）

ディファインドアプローチによる皮膚感作性評価法を医薬部外品・化粧品の
安全性評価に活用するためのガイダンスについて

今般、「医薬品等の安全性評価に用いる動物試験代替法の開発、評価及び国際標準化に関する研究」（日本医療研究開発機構研究費（医薬品等規制調和・評価研究事業、研究開発代表者 足利太可雄））において、医薬部外品・化粧品の安全性評価に皮膚感作性試験代替法の活用促進を図るため、その評価法を用いた際の評価フローや留意点等を取りまとめたガイダンスが別添のとおり作成されたので、貴管下関係業者に対して周知願います。

ディファインド アプローチによる皮膚感作性評価法を

医薬部外品・化粧品の安全性評価に活用するためのガイダンス

「医薬部外品・化粧品の安全性評価のための複数の皮膚感作性試験代替法を組合せた評価体系に関するガイダンス」¹⁾では、当該物質の感作性を評価するために、Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) によるディファインド アプローチ (Defined Approach: DA、定義済み総合判定方式) による皮膚感作性評価法^{*}に、経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD) 試験法ガイドライン (Test Guideline: TG) 442C²⁾、442D³⁾及び 442E⁴⁾として採択されている皮膚感作性試験代替法が用いられている。さらに、DA の具体的な事例として、感作成立において必須である 3 つの主な事象 (Key Event; KE) を反映した 3 つの試験法 (Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)、KeratinoSensTM 及び human Cell Line Activation Test (h-CLAT)) を組み合わせ、ボトムアップ方式、すなわち非感作性の正確な識別から始める評価方式としてボトムアップ 3 out of 3 (3o3)が発出されている。ボトムアップ 3o3 は、DPRA、KeratinoSensTM 及び h-CLAT を実施し、3 試験すべての結果が陰性と判定された場合、当該物質の皮膚感作性は陰性と判定される。ただし、ボトムアップ 3o3 は偽陰性が少ない一方で偽陽性が多いことから、1 試験でも陽性と判定された場合における最終的な感作性の判定は、追加の評価に基づき行うべきであるとされている。また、将来的に、*in silico* ツールによる評価など、活用可能な情報源及び評価方法を拡張することを前提として作成されている。

一方、OECD ガイドライン 497「Defined Approaches for Skin Sensitization; DASS」には、2 out of 3 (2o3) DA、Integrated test strategy (ITS) v1 DA、及び ITSv2 DA の 3 つの DA が収載されている⁵⁾。OECD ガイドライン 497 に記載されている DA は、OECD TG 化されている DPRA、KeratinoSensTM 及び h-CLAT を用いており、中でも ITS DA (ITSv1 DA 及び ITSv2 DA) では *in silico* ツールの情報も利用する。DASS については、将来的な IATA による次世代型リスクアセスメント (Next Generation Risk Assessment; NGRA) の実現に向けて、感作性強度の情報や類似物質を用いたリードアクロスによる評価などとともに、NGRA の情報源としての活用が活発に議論されている。

これまで、新規試験法評価会議 (通称: JaCVAM 評価会議) では、OECD ガイドライン 497 及び皮膚感作性試験資料編纂委員会により作成された「評価報告書 ディファインドアプローチによる皮膚感作性評価法」⁶⁾をもとに DA の科学的妥当性、社会的受け入れ性及び行政上の利用性について検討された⁷⁾。これらの検討をふまえ、本ガイダンスは、医薬部外品・化粧品の安全性評価に皮膚感作性試験代替法の活用促進を図るため、OECD ガイドライン 497 に収載された DASS について、皮膚感作性の有害性の有無を判定する観点で解説するとともに、留意点等を取りまとめたものである。

※本ガイダンスにおいては、DA について文献 7 で用いられた訳語にもとづいて記述することとした。

略語

2o3	2 out of 3
3o3	3 out of 3
BR	Borderline Range
CAS	Chemical Abstracts Service
DA	Defined Approach
DASS	Defined Approaches for Skin Sensitization
DPRA	Direct Peptide Reactivity Assay
EC	European Community
h-CLAT	human Cell Line Activation Test
IATA	Integrated Approaches to Testing and Assessment
InChI	International Chemical Identifier
ITS	Integrated Test Strategy
KE	Key Event
LLNA	Local Lymph Node Assay
MIT	Minimum Induction Threshold
NGRA	Next Generation Risk Assessment
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry System
SSCI-Net	Skin Safety Case Information Network
TG	Test Guideline

1. OECD ガイドライン 497 に収載された DASS

OECD ガイドライン 497 に収載されている DA は次の通りである。

2o3 DA： KE1 (Protein binding) に該当する *in chemico* 試験法である DPRA、KE2 (keratinocyte activation) に該当する *in vitro* 試験法である KeratinoSens™、及び KE3 (dendritic cell activation) に該当する *in vitro* 試験法である h-CLAT のデータに基づき、皮膚感作性を判定（ただし、個々の試験の不確定要素を減らすためにボーダーラインレンジ (Borderline Range; BR) が設定されている）

ITSv1 DA： KE1 に該当する *in chemico* 試験法である DPRA、KE3 に該当する *in vitro* 試験法である h-CLAT 及び *in silico* ツール (Derek Nexus; Lhasa Limited, <https://www.lhasalimited.org/products/derek-nexus.htm>) のデータに基づき、既定のデータ解釈手順により皮膚感作性を判定

ITSv2 DA： KE1 に該当する *in chemico* 試験法である DPRA、KE3 に該当する *in vitro* 試験法である h-CLAT 及び *in silico* ツール (OECD QSAR Toolbox; <https://www.oecd.org/chemicalsafety/oecd-qsar-toolbox.htm>) のデータに基づき、既定のデータ解釈手順により皮膚感作性を判定

2. ボトムアップ 3o3 と OECD ガイドライン 497 に収載された DASS (2o3 DA、ITS DA) の違い

「医薬部外品・化粧品の安全性評価のための複数の皮膚感作性試験代替法を組合せた評価体系に関するガイダンス」¹⁾におけるボトムアップ 3o3 は、OECD TG 442C²⁾、442D³⁾及び 442E⁴⁾として採択されている皮膚感作性試験代替法のうち、DPRA、KeratinoSens™ 及び h-CLAT を実施し、3 試験すべての結果が陰性と判定された場合、当該物質の皮膚感作性は陰性と判定される。ただし、ボトムアップ 3o3 は偽陰性が少ない一方で偽陽性が多いことから、1 試験でも陽性と判定された場合における最終的な感作性の判定は、追加の評価に基づき行うべきであるとされている。

OECD ガイドライン 497 に収載された DASS のうち、2o3 DA については、次節の通り 3 つの KE1～3 の *in chemico/in vitro* 試験(すなわち DPRA、KeratinoSens™ 及び h-CLAT) というボトムアップ 3o3 と同じ情報源を用いるものの、DA としての不確定要素を減らし、予測性を向上させるために BR が設定されているという違いがあることに留意する必要がある。また、全体的な結果は得られた予測の信頼性を考慮に入れた 2 つの一致した結果に基づいて判定される。まず 2 つの KE について試験を行い、これらの試験結果が陽性で一致した場合は感作性、陰性で一致した場合は非感作性と判断される。最初の 2 つの試験結果が一致しない場合は、残りの KE の試験を実施する。

ITS DA は、KE1 と KE3 の試験方法（それぞれ、DPRA と h-CLAT）と、皮膚感作性の *in silico* ツールによる予測を使用する。この際 ITS DA においては、DPRA 及び h-CLAT について、BR を用いずに判定する。DPRA 及び h-CLAT の定量的結果及び *in silico* ツールによる予測結果をスコア化し、それらを合計した総合スコアをもとに感作性の判定を行う。

3. 2o3 DA

3-1. 2o3 DA の判定

感作成立において必須である 3 つの KE1~3（すなわち DPRA、KeratinoSens™ 及び h-CLAT）の *in chemico/in vitro* 試験のうち、3 つまでの試験を順に実施し、皮膚感作性の有害性を判定する。試験の順については定められていない。2 つの KE について試験を行い、これらの試験結果が陽性で一致した場合は感作性、陰性で一致した場合は非感作性と判断される。最初の 2 つの試験結果が一致しない場合は、残りの KE の試験を実施する。全体的な結果は得られた予測の信頼性を考慮に入れた 2 つの一致した結果に基づいて判定される。以上をふまえて、図 1 に示すフローチャートに沿って、2o3 DA の判定を行う。

2o3 DA の個々の試験は、皮膚感作性 KE に基づく OECD TG に含まれる試験（OECD TG 442C²⁾、442D³⁾及び 442E⁴⁾）であるが、2o3 DA においては、DA としての不確定要素を減らし、予測性を向上させるために BR が設定されていることに留意する必要がある、次節及び補遺 1 で概説する。

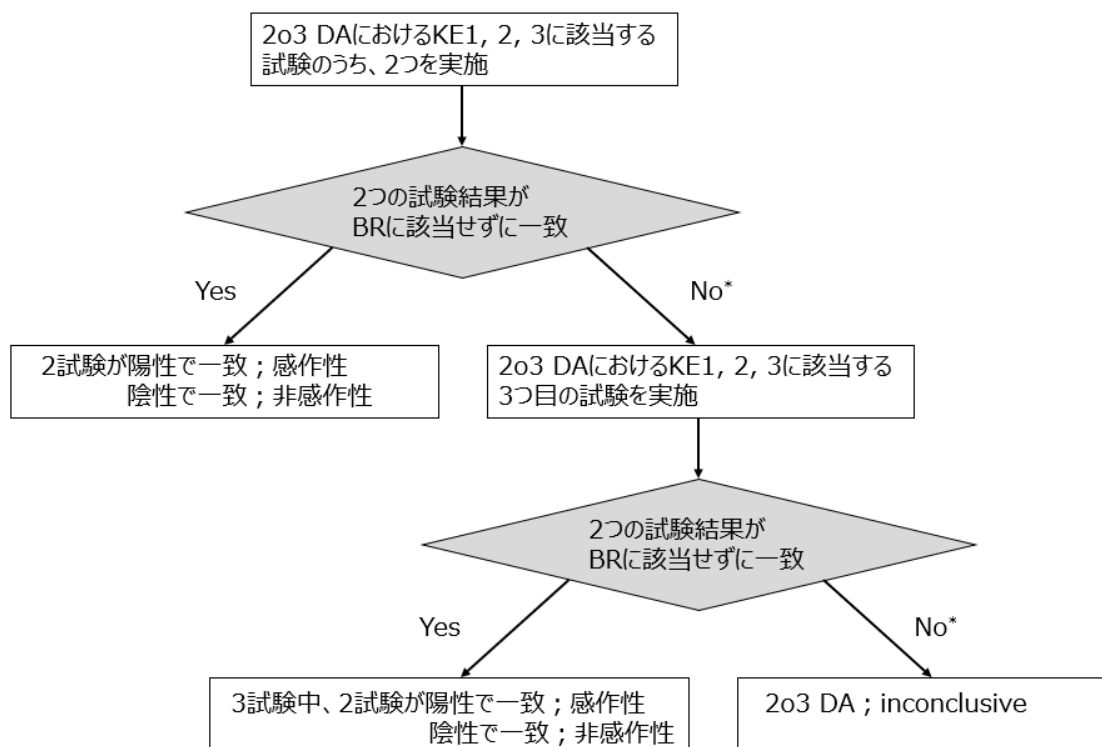


図1：2o3 DA の判定フローチャート(文献5を改編)

* 2つ以上の試験がBRに該当した場合には2o3 DAとしてinconclusiveとなる

3-2. 2o3 DA の留意点

2o3 DAにおいては、DAとしての不確定要素を減らし、予測性を向上させるために陽性基準近傍にある値の採用を再検討する必要がある、バリデーション結果を解析して、BRを設定した。DPRAにおいては、平均ペプチド減少率について4.95～8.32%及びシステインのみの減少率について10.56～18.47%がBRとして設定された。KeratinoSens™においては、ルシフェラーゼ活性の発現値について1.35～1.67倍（コントロール比）がBRとして設定された。さらに、h-CLATにおいては、評価に用いるCD86の発現値について122～184%（コントロール比）あるいはCD54の発現値について157～255%（コントロール比）がBRとして設定された。これらの値はOECD TG 442C¹⁾、442D²⁾及び442E³⁾に示された陽性判定基準とは異なるが、2o3 DAに組み入れる基準にはこれらの値が採用されることになった。BRに該当した物質は各試験法では結論付けることができなくなり、2o3 DAの判定に使われることはない。

図1に示すフローチャートの通り、2o3 DAにおけるKE1～3の*in chemico/in vitro*試験のうち、2つ以上の試験がBRに該当した場合、あるいは1つの試験がBRに該当した上で

残りの 2 つの試験で一致した結果が得られない場合には、2o3 DA として結論付けることができない。一方で、ボトムアップ 3o3（薬生薬審発 0111 第 1 号¹⁾）や次節以降に詳述する ITS DA においては、BR を設定せずに KE1~3 の *in chemico/in vitro* 試験の判定を行うため、2o3 DA と同じ情報源を用いる場合でも DA として結論付けることができる可能性がある。

さらに、混合物（2 つ以上の物質からなる固体又は液体）についてはそれぞれの試験法ガイドライン（OECD TG 442C¹⁾、442D²⁾及び 442E³⁾）において技術的に適用可能であると示されている。しかしながら、細胞を用いた *in vitro* 試験である KeratinoSensTM や h-CLAT において、混合物で細胞毒性が観察された場合、混合物中の細胞毒性成分が試験に干渉する可能性を考慮すべきである（例えば、混合物中に細胞毒性を有する非感作性物質が高濃度で存在すると、*in vitro* 試験で用いている細胞に毒性が生じ、混合物中の感作性物質の反応（KeratinoSensTM におけるルシフェラーゼ活性の発現値、あるいは h-CLAT における CD86/CD54 相対発現値）を覆い隠してしまう可能性があることを考慮すべきである。また、試験困難な物質（不安定な物質など）、又は補遺 2 に記載する適用範囲に明確に含まれない物質の試験を検討する場合、試験結果が科学的に意味のある結果をもたらすかどうかを前もって考慮すべきである。

4. ITS DA

4-1. ITS DA の判定

ITS DA は感作成立において必須である 3 つの KE のうち、KE1 と KE3 の試験方法と、皮膚感作性の *in silico* ツールによる予測を使用する。KE1 の試験には DPRA、KE3 の試験には h-CLAT を使用する。感作性を予測する *in silico* ツールは Derek Nexus（ITSv1 DA）又は OECD QSAR Toolbox（ITSv2 DA）のいずれかが使われる。*In silico* ツールの具体的情報については、補遺 3 に記載する。ITS は DPRA と h-CLAT、及び Derek Nexus 又は OECD QSAR Toolbox の結果をスコア化し、その合計値によって非感作性を判定する。DPRA と h-CLAT は、皮膚感作性の KE に基づく OECD TG に含まれる試験（OECD TG 442C、442E）であり、方法はそれぞれの TG に詳述されている。

表 1：ITS DA の概略

Score	h-CLAT (MIT値)	DPRA (平均減少率)	DPRA (システインペプチド減少率)	<i>In silico</i> ツール
3	≤10 µg/mL	≥42.47%	≥98.24%	
2	>10, ≤150 µg/mL	≥22.62, <42.47%	≥23.09, <98.24%	
1	>150, ≤5000 µg/mL	≥6.38, <22.62%	≥13.89, <23.09%	陽性
0	-	<6.38%	<13.89%	陰性

h-CLAT 及び DPRA の定量的結果は、表 1 のように 0 から 3 のスコアに変換される。h-CLAT においては、CD86 相対発現値の最小閾値濃度である EC150 及び CD54 相対発現値である EC200 の低値を最小誘導閾値 (Minimum Induction Threshold: MIT) として設定し、その MIT 値を 10 及び 150 µg/mL のカットオフ値に基づいて 0 から 3 のスコアに変換する。DPRA においては、TG 442C に記載されている閾値に基づいて、システインペプチド及びリジンペプチドの平均減少率を 0 から 3 のスコアに変換する。*In silico* ツールによる予測においては、陽性の結果はスコア 1 に、陰性の結果はスコア 0 となる。各スコアを合計した総合スコアが 2 未満の場合、当質は非感作性と判定される。

ITSv1 DA で用いられる *in silico* ツールは皮膚感作を含むいくつかの毒性エンドポイントに関する警告構造を含む専門的な知識ベースのソフトウェアである Derek Nexus から導かれる。Derek Nexus は、ハプテンが皮膚のタンパク質に直接あるいは代謝/自動酸化後に求電子的に結合する可能性を示す構造的な特徴を検出する。一方、ITSv2 DA で用いられる *in silico* ツールは OECD QSAR Toolbox の皮膚感作性有害性予測の自動ワークフローから導かれる。標的物質はタンパク質結合アラートについてプロファイリングされる。さらに自動酸化生成物及び皮膚代謝物についてもタンパク質結合アラートについてプロファイリングされる。親物質又はその生物学的代謝物中にタンパク質結合アラートが同定された場合、同じアラートを持つ物質で皮膚感作性データがあるものを類似物質とする。タンパク質結合アラートが同定されない場合、構造プロファイラーを用いて類似物質を同定し、適切な類似物質が自動的に同定されない場合にはリードアクロス又はプロファイラーの結果から直接データギャップを埋める。

4-2. ITS DA の留意点

ITS DA では使用する *in silico* ツールがそれぞれ定期的にアップデートされており、OECD ガイドライン 497 にて議論されているもの (ITSv1 DA で用いる Derek Nexus v6.1.0 及び ITSv2 DA で用いる OECD QSAR Toolbox v4.5) と異なるバージョンで評価することになり得る点について留意する必要がある。ただし、評価に使用したバージョンについて ITS DA としての信頼性及び予測性を十分に担保できた場合には、情報源として ITS DA に

組み込める可能性がある。

さらに、使用する *in silico* ツールの適用範囲に留意する必要がある。ITS DA におけるデータの解釈手順によっては、適用範囲外の物質に関しては信頼度の低い予測をもたらす可能性があり、結論付けることができないとの判断が下される。*In silico* ツールを含む DASS では、ユーザーは個々の *in silico* ツールの限界と適用範囲を参照し、結果の判断を行う必要がある。*In silico* ツールでは、標的物質の化学構造を予測の情報源として使用するため、標的物質が混合物の場合や化学構造が不明な場合には、適用が困難となる。*In silico* ツールの予測は入力された化学構造に依存しており、描画された化学構造、SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) 記法や InChI (International Chemical Identifier) による化学構造の線形表記によって入力できる。また、単一の化学物質は立体構造の違い、塩の違い、混合物中の主成分の違いなどにより、いくつかの CAS (Chemical Abstracts Service) 又は EC (European Community) 番号で表されるため、正確な構造を特定することが重要である。

5. DASS の予測性

2o3 DA、ITSv1 DA 及び ITSv2 DA の予測性に関して、Local Lymph Node Assay (LLNA)⁸⁾及びヒトデータとの比較結果を表 2 に示す。ヒトデータの具体的情報については、補遺 4 に記載する。

2o3 DA は LLNA 結果との比較において、バランス精度(感度と特異度の平均値)は 84%、感度は 82%、特異度は 85%であった。一方、ヒト皮膚感作性結果との比較において、2o3 DA のバランス精度は 88%、感度は 89%、特異度は 88%と LLNA (バランス精度は 58%、正確度は 94%、特異度は 22%) よりも全体的に高かった。

ただし、2o3 DA における KE1~3 の *in chemico/in vitro* 試験のうち、2 つ以上の試験が BR に該当した場合、あるいは 1 つの試験が BR に該当した上で残りの 2 つの試験で一致した結果が得られない場合には、2o3 DA として結論付けることができない。表 2 に示された結果をふまえると、LLNA 結果との比較においては 20% (168 物質中 34 物質)、ヒト皮膚感作性結果との比較においては 15% (65 物質中 10 物質) に相当する物質が、2o3 DA で結論付けることができなかった。一方で、ボトムアップ 3o3 や ITS DA など他の DA においては、BR を設定せずに KE1~3 の *in chemico/in vitro* 試験の判定を行うため、2o3 DA と同じ情報源を用いる場合でも DA として結論付けることができる可能性がある。このことから、2o3 DA として結論付けることができなかった場合でも、他の DA などのデータに基づく追加検討により、総合的に皮膚感作性の安全性を担保できる可能性がある。

ITSv1 DA は LLNA 結果との比較において、バランス精度は 81%、感度は 91%、特異度は 70%であった。ヒト皮膚感作性結果との比較において、ITSv1 DA のバランス精度は 69%、感度は 93%、特異度は 44%と LLNA と比べて同等以上であった。さらに、ITSv2 DA は LLNA 結果との比較において、バランス精度は 80%、感度は 93%、特異度は 67%であった。ヒト皮膚感作性結果との比較において、ITSv2 DA のバランス精度は 69%、感度は 94%、特異度は 44%と LLNA と比べて同等以上であった。

このように、2o3 DA、ITSv1 DA 及び ITSv2 DA では一部の感作性物質に対して偽陰性となるものの、これら偽陰性となった物質の中には UN GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) 区分 1A 物質はなく、これらの評価法による皮膚感作性の有害性の有無の予測は妥当と考えられる⁷⁾。

一方で、LLNA がヒト皮膚感作性結果との比較において特異度が低く偽陽性が多いのと同様に (ヒト皮膚感作性結果との比較において、LLNA の特異度は 22%)、一部の DA では特異度が低く偽陽性が多い (ヒト皮膚感作性結果との比較において、ITSv1 DA 及び ITSv2 DA の特異度は 44%)。このことから、両 ITS DA で「感作性あり」と判定された物質でも、十分に使用実績のあることが知られている類縁物質の皮膚感作性データとの比較 (例：リードアクロス) 又は種々のデータ (例：*in silico* ツール、ヒト試験) 等に基づく追加検討により、総合的に皮膚感作性の安全性を担保できる可能性がある。

表 2 DASS の予測性
(ガイドライン 497 より改変)

2o3 DA			
LLNA			
		Non	Sens
2o3 DA	Non	22	19
	Sens	4	89
	Inconclusive	7	27
DA performance vs. LLNA			
Balanced Accuracy (%)			
Sensitivity (%)			
Specificity (%)			
n=134			
ITSv1 DA			
LLNA			
		Non	Sens
ITSv1 DA	Non	21	11
	Sens	9	118
	Inconclusive	3	6
DA performance vs. LLNA			
Balanced Accuracy (%)			
Sensitivity (%)			
Specificity (%)			
n=159			
ITSv2 DA			
LLNA			
		Non	Sens
ITSv2 DA	Non	20	9
	Sens	10	117
	Inconclusive	3	9
DA performance vs. LLNA			
Balanced Accuracy (%)			
Sensitivity (%)			
Specificity (%)			
n=156			
LLNA			
		Non	Sens
LLNA	Non	2	3
	Sens	7	44
	Inconclusive		
LLNA performance vs. Human			
Balanced Accuracy (%)			
Sensitivity (%)			
Specificity (%)			
n=56			

6. DASS の限界

DASS を利用する際は、個々の *in chemico/in vitro* 試験や *in silico* ツール の限界に基づいて留意する必要がある。DASS 予測の信頼性を決定するための *in chemico/in vitro* 試験法の限界の使用に関する詳細は、それぞれの試験法ガイドライン (OECD TG 442C²⁾、442D³⁾ 及び 442E⁴⁾) に示されている。また、2o3 DA では、信頼性が低い領域を定義するために、3つの KE に対応する個々の試験法に BR が定義されている。したがって、これらの BR に該当する試験結果、並びに個々の試験法の限界 (例えば、Log P > 3.5 の当該物質に対して得られた h-CLAT の結果が陰性である場合 (OECD TG 442E⁴⁾ に準拠)) について、その試験結果の信頼性は低く、該当した物質は各試験法で結論付けることができなくなり、DASS の判定に使われることはない。その場合、DASS の結論が出ない場合があることに留意する必要がある。

また、ITS DA に用いられる *in silico* ツールでは、標的物質の化学構造を予測の情報源として使用するため、予測は入力された化学構造に依存している。描画された化学構造、SMILES 記法や InChI による化学構造の線形表記によって入力する必要があり、標的物質の正確な化学構造を特定することが重要である。

7. DASS を構成する試験法の互換性

2o3 DA、ITSv1 DA、及び ITSv2 DA の 3つの DASS で用いられる試験法と類似の試験法について、信頼性及び予測性が十分に担保されている場合には、確かな情報源として DASS に組み込める可能性がある。ただし、当該試験法を組み込んだ新たな DASS については、予測性が LLNA 等の動物実験又はヒトデータと同等以上であることの確認及び適用限界の明確化が必要である。

8. 本ガイダンスの拡張性

皮膚感作性評価については現在様々な試験法の開発が進められており、今後 DASS の情報源として活用できる可能性がある。したがって、本ガイダンスは将来的に、活用可能な情報源及び評価方法を拡張することを前提として作成されていることに留意する必要がある。

なお、国民の化粧品等による皮膚障害被害を早期に発見し最小化を図ることを目指し、化粧品等による皮膚健康障害症例報告を臨床医から収集し、関係省庁やメーカーへ情報の提供を行う一般社団法人 SSCI-Net (Skin Safety Case Information Network: 皮膚安全性症例情報ネット) が設立されており、他の臨床情報も含めて皮膚感作性の評価に使用可能な情報源としての活用が期待される (補遺 5)。

9. 引用文献

1. 医薬部外品・化粧品の安全性評価のための複数の皮膚感作性試験代替法を組合せた評価体系に関するガイダンスについて（平成 30 年 1 月 11 日薬生薬審発 0111 第 1 号）
2. OECD (2024), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation_9789264229709-en
3. OECD (2024), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442d-in-vitro-skin-sensitisation_9789264229822-en
4. OECD (2024), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-in-vitro-skin-sensitisation_9789264264359-en
5. OECD (2023), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/guideline-no-497-defined-approaches-on-skin-sensitisation_b92879a4-en
6. JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会 評価報告書：ディファインド アプローチによる皮膚感作性評価法（令和 7 年 1 月 9 日）
7. JaCVAM 評価会議 評価会議報告書：ディファインド アプローチによる皮膚感作性評価法（令和 7 年 1 月 9 日）
8. OECD (2010), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. Paris, France: Organisation for Economic

Cooperation and Development. Available at: <https://www.oecd.org/env/test-no-429-skin-sensitisation-9789264071100-en>

補遺 1 2o3 DA の概要

1.概要

2o3 DA は動物を用いた試験を使用せずに、皮膚感作性の有害性を判断する方法である。2o3 DA に含まれている試験方法の組み合わせは、皮膚感作性をもたらす AOP の最初の 3 つの KE のうち、少なくとも 2 つをカバーしている。2 つの KE について試験を行い、これらの試験結果が一致した場合、その被験物質は感作性物質又は非感作性物質と予測される。最初の 2 つの試験結果が一致しない場合は、残りの KE の試験を実施し、計 3 試験中、2 つの一致した結果に基づいて判定される。

1-2. 2o3 DA に用いられる情報源とその適用範囲

1-2-1. 2o3 DA に用いられる情報源とその適用範囲

OECD ガイドライン 497¹⁾に載されている 2o3 DA の情報源は次の通りである。

- Direct Peptide Reactivity Assay(DPRA): Protein binding (KE1) に該当する *in chemico* 試験(OECD TG442C²⁾)
- KeratinoSens™: KE2 (keratinocyte activation) に該当する *in vitro* 試験(OECD TG442D³⁾)
- Human Cell Line Activation Test (h-CLAT): KE3 (dendritic cell activation) に該当する *in vitro* 試験(OECD TG442E⁴⁾)

評価物質は、溶解度に関する制限など、個々の *in chemico/in vitro* 試験法の適用範囲に入っている必要がある。

1-2-2. ボーダーラインレンジ

本文における 2o3 DA の留意点で記載されているように、DA としての不確定要素を減らし、予測性を向上させるため、陽性基準近傍にある値の採用を再検討する必要があり、バリデーション結果を解析して、以下のボーダーラインレンジ(Borderline Range; BR) が設定されている。

- DPRA BR: mean peptide depletion: 4.95～8.32%, Cys-only depletion (in the case of co-elution with lysine peptide): 10.56～18.47%;
- KeratinoSens™ BR: Imax: 1.35～1.67-fold;
- h-CLAT BR: RFI CD54: 157～255%; RFI CD86: 122～184%.

1-2-3. 個々の情報源における試験結果評価フロー

1-2-2-1. DPRA

DPRA の場合、システインペプチドとリジンペプチドの平均減少率が 3～10% (シ

ステインペプチドのみの減少を評価するモデル（Cys only model）を使用する場合は 9～17%）の範囲内にある場合は、繰り返し実験を実施する必要がある。図 1 のフローチャートにより、2o3 DA における最終結論を決定する。

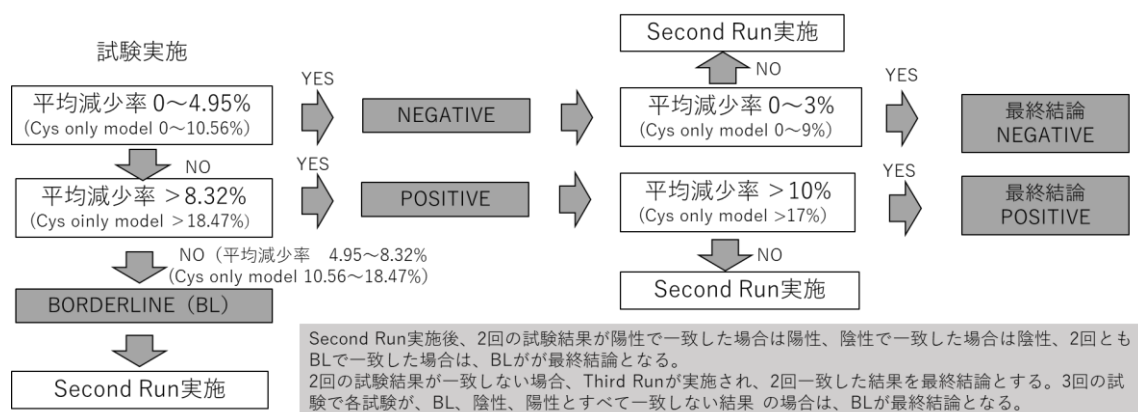


図 1-1：DPRA における結果判定フローチャート(文献 2 を改編)

1-2-2-2. KeratinoSens™

KeratinoSens™ アッセイの結果判定には複数回の試験実施が必要である。試験実施が KeratinoSens™ で陽性、陰性、又は BR の最終結果をもたらすかどうかの評価には、図 2 のフローチャートを適用する。

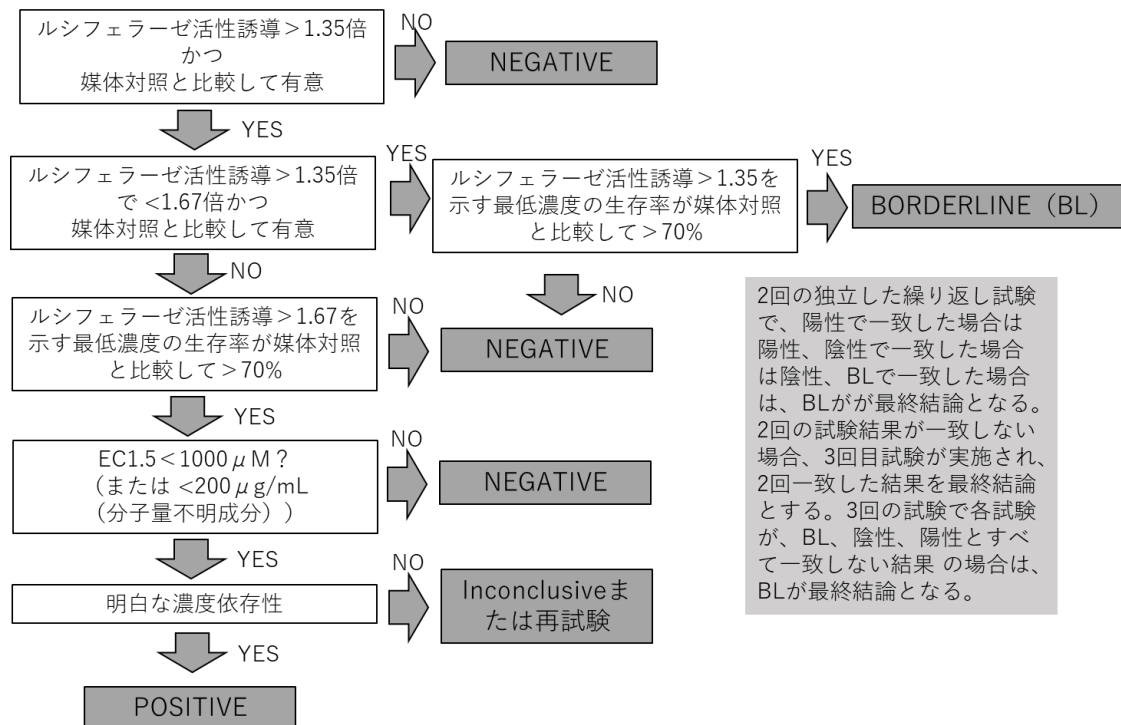


図 1-2 : KeratinoSens™における結果判定フローチャート(文献 3 を改編)

1-2-2-3. h-CLAT

h-CLAT の結果判定には複数回の試験実施が必要である。試験実施結果が h-CLAT で陽性、陰性、又は BR の最終結果をもたらすかどうかの評価には、図 3 のフローチャートを適用する。

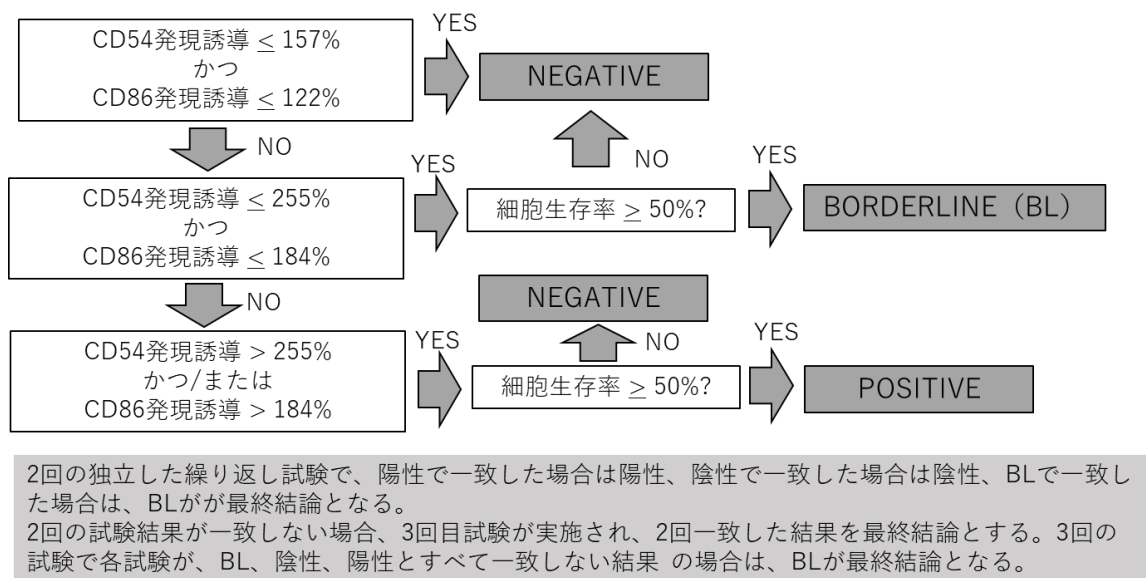


図 1-3：h-CLAT における結果判定フローチャート(文献 4 を改編)

1-2-4. 個々の試験結果評価と適用範囲

- KE1、2、3 に該当する各試験において、BR に該当する陽性及び陰性の検査結果、及び *in chemico/in vitro* テストガイドラインの適用範囲外に起因する「Inconclusive」結果は、信頼度が低くなる。
- 例えば、 $\text{Log } P > 3.5$ の物質に対して得られた陰性の h-CLAT 結果は信頼性が低く、以下に説明するように 2o3 DA の結果に影響を与える。
 - 情報源 (DPRA、KeratinoSens™、h-CLAT) の評価結果のうち、1 つが BR に該当する場合でも、2o3 DA を構成する他の 2 つの試験結果が一致していて信頼性が高ければ (BR 非該当)、2o3 DA 予測を行うことができる。
 - 同様に、 $\text{Log } P > 3.5$ の物質に対して、h-CLAT で陰性結果が得られた場合でも、2o3 DA を構成する他の 2 つの試験法の結果が一致しており、高い信頼性があれば (2 つとも BR 非該当)、2o3 DA の予測を行うことができる。
 - ただし、情報源 (DPRA、KeratinoSens™、h-CLAT) の評価結果のうち、いずれかの結果が BR に該当するか、 $\text{Log } P > 3.5$ の物質に対して陰性の h-CLAT 結果が得られ、2o3 を構成する他の 2 つの方法で、信頼性のある一致した結果が得られない場合は、2o3 DA 判定は「Inconclusive」となる。

2. 引用文献

1. OECD (2023), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/guideline-no-497-defined-approaches-on-skin-sensitisation_b92879a4-en
2. OECD (2024), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation_9789264229709-en
3. OECD (2024), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442d-in-vitro-skin-sensitisation_9789264229822-en
4. OECD (2024), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-in-vitro-skin-sensitisation_9789264264359-en

補遺 2 *In chemico/in vitro* 試験の具体的情報

下記に、本ガイダンスで解説した DASS に用いる *in chemico/in vitro* 試験である DPRA、KeratinoSens™ 及び h-CLAT について、OECD TG 442C²⁾、442D³⁾ 及び 442E⁴⁾ に記載されている内容をもとに試験法の概要をまとめる。

なお、下記の概要には、「医薬部外品・化粧品の安全性評価のための複数の皮膚感作性試験代替法を組合せた評価体系に関するガイダンス」¹⁾の発出以来、OECD TG 442C²⁾、442D³⁾ 及び 442E⁴⁾ において改定がなされた点も反映されている。これら改定点は、「医薬部外品・化粧品の安全性評価のための複数の皮膚感作性試験代替法を組合せた評価体系に関するガイダンス」¹⁾におけるボトムアップ 3o3 にも適用可能である。

本編及び補遺 1 にも記載した通り、2o3 DA においては、DA としての不確定要素を減らし、予測性を向上させるために陽性基準近傍にある値の採用を再検討する必要がある、バリデーション結果を解析して、BR を設定したことに注意が必要である。BR の値は OECD TG 442C²⁾、442D³⁾ 及び 442E⁴⁾ に示された陽性判定基準とは異なるが、2o3 DA に組み入れる基準にはこれらの値が採用されることになった。一方で、ITS DA においては、DPRA 及び h-CLAT について、BR を用いずに判定する。

1. ペプチド結合性試験 (Direct Peptide Reactivity Assay : DPRA)

本試験では、皮膚内のタンパク質の代わりに合成ペプチドであるシステイン含有ペプチド (Ac-RFAACAA-COOH) とリジン含有ペプチド (Ac-RFAAKAA-COOH) の 2 種類を使用する。被験物質と各ペプチドを混合し、反応させ、混合 24 時間後における未反応のペプチド量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離定量する。その結果をもとに、被験物質の反応性を 4 段階 (High、Moderate、Low、No or Minimal) に分類する。

詳細な試験手順や試験成立条件を確認する場合には、OECD TG 442C²⁾を参照する。

被験物質の反応性は、測定ごとのペプチド減少率から平均値を算出し、以下の DPRA 分類予測モデルに従って反応性を分類する。反応性の分類で、Low、Moderate 及び High に分類される被験物質は陽性、No or Minimal に分類される被験物質は陰性と予測する。なお、ペプチドと被験物質の溶出時間が重なる場合、ペプチド減少率の算出が不可能となるが、溶出時間の重なりをリジン含有ペプチドでのみ認める場合には、システイン含有ペプチドの結果から「システイン 1:10 のみの予測モデル」に従い、反応性を分類し、予測する。

システイン 1:10 及びリジン 1:50 の予測モデル

システインの減少率とリジンの減少率の平均値	反応性の分類	DPRA 予測
0%≦減少率の平均値≦6.38%	No or Minimal	陰性
6.38%<減少率の平均値≦22.62%	Low	陽性
22.62%<減少率の平均値≦42.47%	Moderate	
42.47%<減少率の平均値≦100%	High	

システイン 1:10 のみの予測モデル

システインの減少率	反応性の分類	DPRA 予測
0%≦減少率の平均値≦13.89%	No or Minimal	陰性
13.89%<減少率の平均値≦23.09%	Low	陽性
23.09%<減少率の平均値≦98.24%	Moderate	
98.24%<減少率の平均値≦100%	High	

システイン 1:10 及びリジン 1:50 の予測モデルのシステインの減少率とリジンの減少率の平均値が 3～10%又はシステイン 1:10 のみの予測モデルのシステインの減少率が 9～17%である場合等、陰性と陽性の判定基準値に近接した結果の場合は、2 回目の試験実施を検討し、1 回目と 2 回目の結果が一致していない場合は 3 回目の試験を実施する。

これまでの評価で、本試験法は様々な物質の皮膚感作性の予測が可能であることが示されているが、以下の場合について留意する必要がある。

(1) 金属化合物

金属化合物は、共有結合以外の機構でタンパク質と反応することが知られているので適用できない。

(2) プロハプテン及びプレハプテン

本試験系は代謝系を有さない単純な化学反応を検出する *in chemico* 試験系であることから、プロハプテン（感作能獲得に代謝が必要な物質）は検出できない。プレハプテン（感作能獲得に自動酸化が必要な物質）については正しく検出できる場合がある。これらについての陰性結果は DA の枠組みの中で他の情報と関連付けて解釈すべきである。

(3) 220nm で有意に吸収され、ペプチドと同じ保持時間を持つ被験物質

共溶出が起これと、ペプチドのピークを積分することができず、ペプチドの減少率を計算することができない。

(4) 複雑な混合物

組成が未知の混合物の場合、試験溶液は、全成分の重量を基準として 20 mg/mL の濃度になるように調製することができる（重量法）。なお、この値は既定の分子量 200 g/mol に基づいている。評価対象の混合物が、分子量が著しく高い物質を含むことが知られている場合、この既定の分子量と試験溶液濃度を適宜再設定する必要がある。

(5) 100 mmol/L の被験物質溶液が調製できない物質

被験物質は、最終濃度 100 mmol/L で適切な溶媒に溶解する。この濃度で溶解しない被験物質は、さらに低い濃度で試験を実施することはできる。この場合、陽性の結果が得

られれば被験物質が皮膚感作性物質であると言えるが、陰性の結果では反応性が低いと言う結論を導くことはできない。

(6) 反応液中で沈殿する物質

十分な曝露が可能かどうかは不明であり、陽性の結果が得られれば被験物質が皮膚感作性物質であると言えるが、陰性の結果では、反応性が低いと言う結論を導くことはできない。

(7) ペプチドに対する酸化能を有する物質

ペプチド結合能はないが、ペプチドの酸化（システインの 2 量体化）を促進する被験物質は、ペプチド反応率を過大評価する可能性があり（ペプチドダイマー形成により、見かけ上ペプチドが減少したように見える）、結果として被験物質を偽陽性と予測することになる。

(8) ジメチルスルホキシドにしか溶解しない物質

ジメチルスルホキシドはシステインの二量化によりペプチドの過剰な減少を引き起こし、その結果バックグラウンドのシステイン減少が高くなり、偽陰性結果につながる可能性がある。

2. ケラチノサイト株レポーターアッセイ (ARE-Nrf2 Luciferase Test Method)

本試験の基本的原理は、Nrf2-Keap1-ARE pathway を利用したレポーターアッセイである。Nrf2-Keap1-ARE pathway は、転写因子 Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2)、Nrf2 の抑制因子である Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) 及び ARE が関係する遺伝子発現経路である。無刺激時、Nrf2 は Keap1 と結合し、ARE に依存して発現する遺伝子群の発現量を制御している。Keap1 のシステイン残基に求電子性の物質が結合すると、Nrf2 は Keap1 から解離し、核内へ移行して DNA 上の ARE に結合する。その結果、下流の遺伝子群の発現が誘導され、物質による障害から細胞を保護するために機能する。多くの皮膚感作性物質が Nrf2-Keap1-ARE pathway を活性化する。本試験法は、ARE 制御下のルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定的に取り込んだトランスジェニック細胞系を用いる。被験物質により Nrf2-Keap1-ARE pathway が活性化されるとルシフェラーゼ遺伝子が発現する。基質を添加し、ルシフェラーゼが触媒する反応の発光強度を測定することにより、被験物質の皮膚感作性を評価する。

詳細な試験手順や試験成立条件を確認する場合には、OECD TG 442D³⁾を参照する。

本試験法の判定には、測定値から以下のパラメータを求める。

- ・被験物質及び陽性対照で観察されたルシフェラーゼ活性の最大誘導倍率：Imax
- ・ルシフェラーゼ活性誘導 (Fold induction) が溶媒 (陰性) 対照の 1.5 倍の閾値 (ルシフェラーゼ活性が 50%増加) を超えた濃度：EC1.5
- ・細胞生存率が 50%及び 70% (30%減) となる濃度 IC50 及び IC30

・各 EC1.5 値について、活性誘導が溶媒（陰性）対照に対して統計学的に有意（ $p < 0.05$ ）であるかを検証する。少なくとも 2 回の繰り返し測定を行うが、3 回目を行う場合も含めて、それぞれの繰り返し測定は日を変えて行い、被験物質の溶液調製及び細胞の前培養（継代数は同じものでもよい）も繰り返し測定ごとに行う。2 回の繰り返し実験の 2 回又は 3 回の繰り返し実験の 2 回で、以下の条件により判定を行う。

(1) I_{max} 値が 1.5 倍以下の誘導であれば陰性と判定

(2) I_{max} 値が 1.5 倍の誘導を越えた場合でも、溶媒（陰性）対照に比較して統計学的に有意でないとき、以下のいずれかの場合には陰性と判定

・1.5 倍を超えるルシフェラーゼ活性の誘導を起こした最低濃度において、細胞生存率が 70%以下

・EC1.5 値が 1000 μM 以上（分子量未知の場合は 200 $\mu\text{g/mL}$ 以上）

ルシフェラーゼの誘導に明らかな濃度依存性が認められないときは結論を下せず、さらに繰り返しの実験が必要となる。また、細胞毒性を示す濃度領域でルシフェラーゼ活性の誘導を示す物質は、わずかな濃度変化で陽性の判定が覆る例がまれにある。このような物質は、より狭い濃度範囲でより小さい希釈系列を用いて、ルシフェラーゼ活性の誘導が細胞毒性濃度で起こるか否かを判定することが必要である。

これまでの評価で、曝露に用いる培養液中で可溶性、又は安定な分散液を形成する被験物質に適用される限り（被験物質が溶媒から沈殿したり、異なる相に分離したりしないコロイド又は懸濁液となる限り）、本試験法は様々な物質の皮膚感作性の予測が可能であることが示されている。

一方で、以下の場合について留意する必要がある。

(1) 脂溶性が極めて高い物質

LogP が 7 以上の物質は、曝露媒体に不溶性である可能性がある。しかし、溶解性又は安定な分散性が得られる場合は、試験を実施することができる。

(2) システイン残基ではなくリジン残基と反応する特徴がある物質（例：酸無水物）

システイン残基との反応に必要な Nrf2 pathway を誘導しないことが推察され、偽陰性と判定されることがある。

(3) プロハプテン及びプレハプテン

使用した細胞株の代謝能力が限られており、プロハプテン（感作能獲得に代謝が必要な物質）は検出できない場合がある。また、実験条件から、特に酸化速度の遅いプレハプテン（感作能獲得に自動酸化が必要な物質）についても検出できない場合がある。これらについての陰性結果は DA の枠組みの中で他の情報と関連付けて解釈すべきである。

(4) 細胞毒性が強い物質

(5) ルシフェラーゼ酵素に干渉する物質（例：植物エストロゲン）

3. h-CLAT (human Cell Line Activation Test)

皮膚感作性物質は、ランゲルハンス細胞等の樹状細胞と同様に、ヒト単球性白血病由来細胞株である THP-1 細胞の表面抗原である CD86 及び CD54 の発現を亢進させることから、本試験においては、この 2 つのマーカーを THP-1 細胞の活性化の指標として用いている。すなわち、本試験は、THP-1 細胞に被験物質を 24 時間曝露させた後に細胞表面の CD86 及び CD54 の発現変化をフローサイトメトリーで測定するという試験法である。

詳細な試験手順や試験成立条件を確認する場合には、OECD TG 442E⁴⁾を参照する。

本試験法の判定には、THP-1 細胞表面に発現する CD86 及び CD54 抗原の発現強度を測定した平均蛍光強度 (MFI: geometric Mean Fluorescence Intensity) から、下に示す式で相対蛍光強度 (RFI: Relative Fluorescence Intensity) を算出する。

RFI (%)

$$= \frac{\text{被験物質処理細胞の MFI} - \text{被験物質処理細胞のアイソタイプコントロールの MFI}}{\text{溶媒処理細胞の MFI} - \text{溶媒処理細胞のアイソタイプコントロールの MFI}} \times 100$$

独立した試験を少なくとも 2 回実施し、陰性基準 (CD86 の RFI<150%かつ CD54 の RFI<200%) 以下であれば陰性と判定する。また、1 回目と 2 回目の判定結果が不一致の場合、3 回目を実施し、陰性基準以下であれば陰性と判定する。

これまでの評価で、曝露に用いる培養液中で可溶性、又は安定な分散液を形成する被験物質に適用される限り (被験物質が溶媒から沈殿したり、異なる相に分離したりしないコロイド又は懸濁液となる限り)、本試験法は様々な物質の皮膚感作性の予測が可能であることが示されている。

一方で、以下の場合について留意する必要がある。

(1) LogKow が 3.5 より大きい物質

溶解性の観点から偽陰性となる可能性がある。

(2) プロハプテン及びプレハプテン

使用した細胞株の代謝能力が限られており、プロハプテン (感作能獲得に代謝が必要な物質) は検出できない場合がある。また、実験条件から、特に酸化速度の遅いプレハプテン (感作能獲得に自動酸化が必要な物質) についても検出できない場合がある。これらについての陰性結果は DA の枠組みの中で他の情報と関連付けて解釈すべきである。

(3) 強い蛍光を発する物質

フルオレセインイソチオシアネート (FITC) やヨウ化プロビジウム (PI) と同じ波長域で強い蛍光を発する物質は、干渉のため FITC で標識した抗体や PI を用いる評価を正しく行えない可能性がある。このような場合、FITC 標識抗体又は PI と同様の結果が得られる

ことが証明される限り、それぞれ他の蛍光色素標識抗体又は他の細胞毒性マーカーを使用することができる。

(4) 細胞毒性が強い物質

4. 引用文献

1. 医薬部外品・化粧品の安全性評価のための複数の皮膚感作性試験代替法を組合せた評価体系に関するガイダンスについて（平成 30 年 1 月 11 日薬生薬審発 0111 第 1 号）
2. OECD (2024), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation_9789264229709-en
3. OECD (2024), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442d-in-vitro-skin-sensitisation_9789264229822-en
4. OECD (2024), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-in-vitro-skin-sensitisation_9789264264359-en

補遺 3 *In silico* ツールの具体的情報

1. ITSv1 DA、ITSv2 DAで用いられている皮膚感作性*in silico*ツール

1-1. Derek Nexus (Lhasa Limited) v.6.1.0

構造的アラートを用いて皮膚感作性を予測する専門知識ベースのツールである。

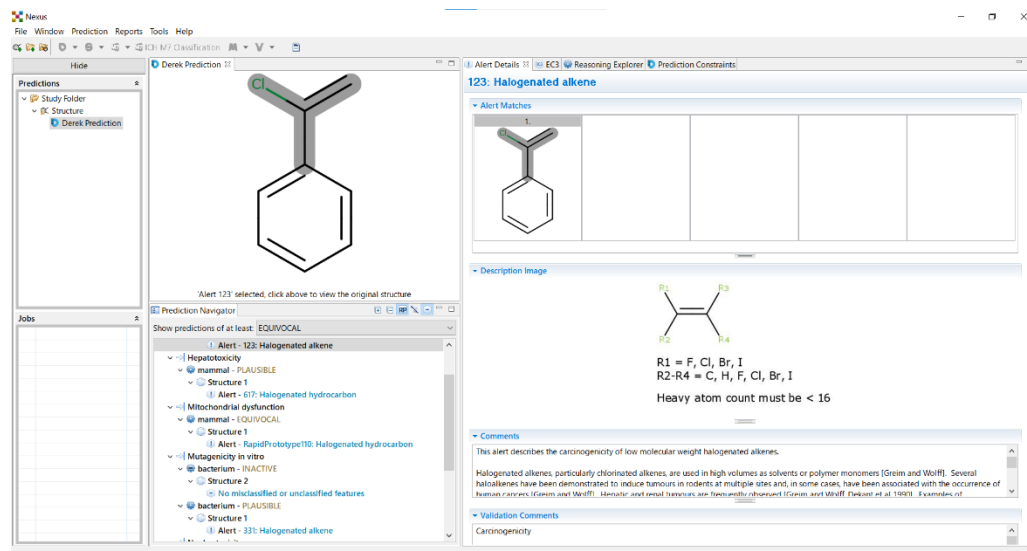


図 2-1 : Derek Nexus (Lhasa Limited) v.6.1.0 の使用画面例

1-2. OECD QSAR toolbox (OECD, ECHA) v.4.5

アナログベースのリードアクロス法あるいはタンパク質結合に関する構造的アラートを用いて化学物質の感作性を予測する計算ツールである。

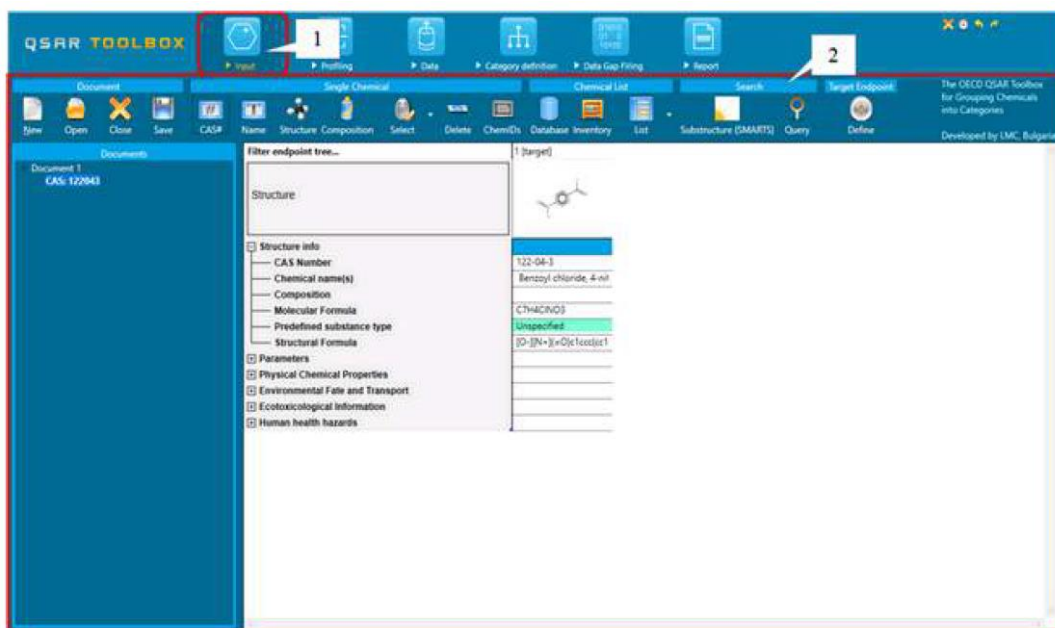


図 2-2 : OECD QSAR toolbox v.4.5 の使用画面例

https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/TB4_Application_manual_F1.compressed.pdf

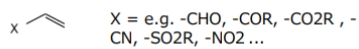
2. *In silico* ツールに用いられているコンセプト

2-1. 構造的アラート

毒性発現に寄与する官能基や部分構造を構造アラートという。皮膚感作性物質の多くは、皮膚タンパク質と共有結合することが感作の最初の事象となる。

以下に、皮膚感作性物質と皮膚タンパク質と代表的な反応機構について示す。

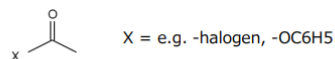
マイケル付加反応 受容体



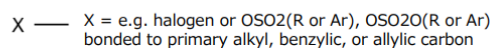
シッフ塩基形成物質



アシル化剤



SN2反応 求電子種



SNAr反応 求電子種

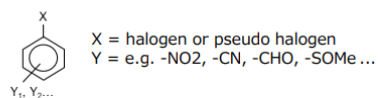


図 2-3：皮膚感作性物質と皮膚タンパク質と代表的な反応機構

2-2. リードアクロス (Read-across)

予測を行いたい（データなし）物質に対して構造類似性のある（データあり）物質のデータを用いて、予測を行いたい物質の毒性等のエンドポイントのデータギャップの穴埋めを行う手法。

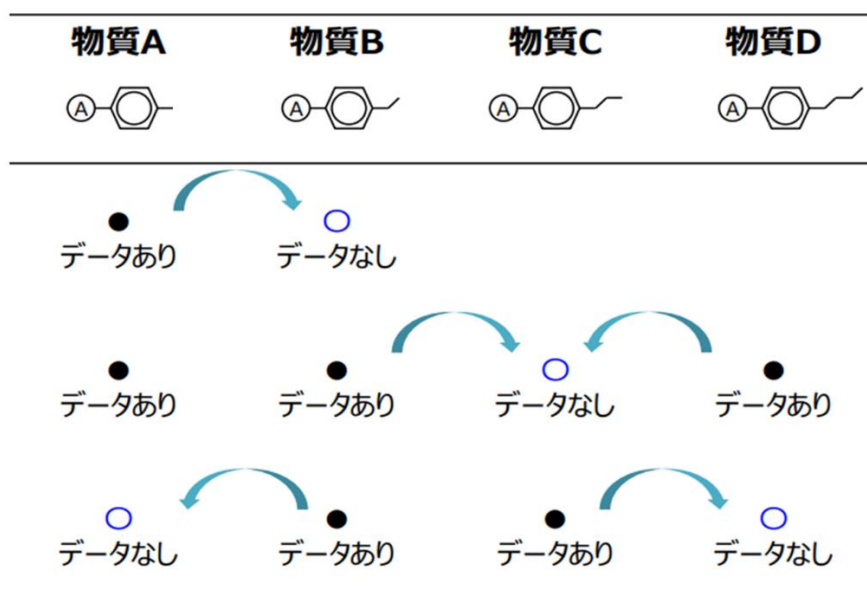


図 2-4：リードアクロスのイメージ

3. *In silico* ツールの限界と対策

3-1. 適用範囲

定義された適用範囲は、それを超えると信頼性の低い予測が得られる可能性がある。(例えば、モデルに含まれる記述子のトレーニングセットの範囲やトレーニングセットに含まれる化学構造の種類)

In silico ツールが含まれている 2 つの DA である ITSv1 DA、ITSv2 DA はそれぞれ ITSv1 DA では DEREK Nexus、ITSv2 DA では OECD QSAR toolbox を利用しており、OECD guideline 497 の Annex 2 において規定されている制限と適用範囲を参照する必要がある。

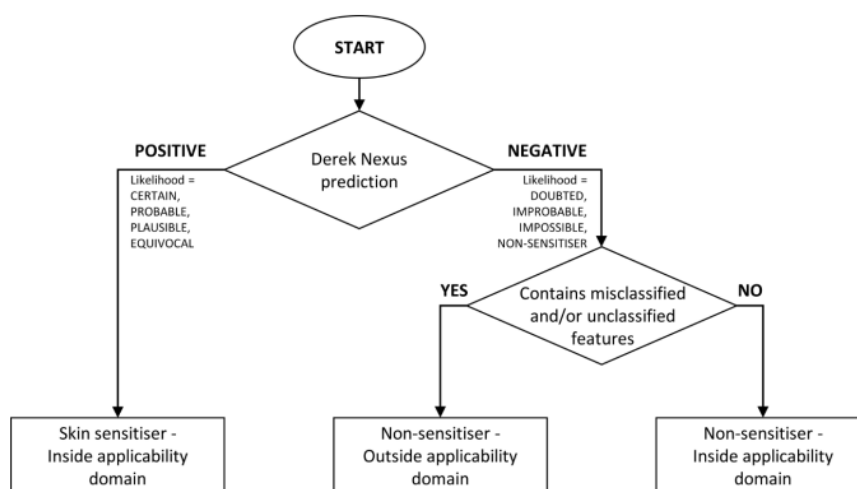


図 2-5：ITSv1 DA で使用されている DEREK Nexus の適用範囲

表 2-4：ITSv2 DA で使用されている OECD QSAR Toolbox (v4.5) 中の
Toolbox DASS automated workflow の適用範囲レイヤー*

Toolbox DASS AW outcome		Applicability domain layer		
		Structural	Parametric	Mechanistic
Positive	Read-across	Not considered	Not considered	Considered
	Profiling	Not considered	Not considered	Met by definition
Negative	Read-across	Not considered	Not considered	Considered
	Profiling	Considered	Considered	Met by definition

*レイヤー：ソフトウェアの構成要素が階層構造になっている場合のそれぞれの要素

3-2. バージョンアップ

In silico ツールはそれぞれ定期的にアップデートされており、OECD ガイドライン 497 にて議論されているもの (ITSv1 DA で用いる Derek Nexus v6.1.0 及び ITSv2 DA で用いる OECD QSAR Toolbox v4.5) とは異なるバージョンで評価することになり得る点について留意する必要がある。ただし、評価に使用したバージョンについて ITS DA としての信頼性及び予測性を十分に担保できた場合には、情報源として ITS DA に組み込める可能性がある。

4. 引用文献

1. OECD (2023), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/guideline-no-497-defined-approaches-on-skin-sensitisation_b92879a4-en
2. Aynur O Aptula, David W. Roberts, 2006. Mechanistic Applicability Domains for Nonanimal-Based Prediction of Toxicological End Points: General Principles and Application to Reactive Toxicity. Chem. Res. Toxicol. 19, 1097-1105
3. 独立行政法人 製品評価技術基盤機構
<https://www.nite.go.jp/chem/qsar/toolbox.html>

補遺 4 ヒトデータの具体的情報

1. 概要

皮膚感作性の DA には様々な *in vitro* 法や *in silico* ツールが用いられている¹⁾が、それらの手法の精度や有用性を検証するためには、堅牢性に優れた適切な reference standard が必要である。2018 年より、OECD の専門家グループ (OECD Expert Group on Defined Approaches for Skin Sensitisation : OECD EG DASS) のサブグループ HDSG (the human data sub- Group) によって利用可能なヒト予測パッチテストデータベースの評価を実施している。この目的は、これらのデータに関連する変動性と不確実性を説明すること、皮膚感作性のポテンシャルに基づいて化学物質を分類する際の有用性を探ること、UN GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) の規則に基づき 200 の参照物質を設定する事である。

ヒトパッチテストデータには、診断用パッチテスト (human diagnostic patch tests : HDPT) と、予測パッチテスト (human predictive patch tests : HPPT) に分類され、HPPT はさらに、ヒト最大化テスト (human maximization test : HMT) とヒト反復パッチテスト (human repeated insult patch test : HRIPT) に分類される。HDSG では、HPPT のみを対象として、参照データの詳細な検証を実施した。

さらに、DASS のベンチマークや HPPT の変動性や不確実性の原因を考慮したデータセットを作成するために、以下の項目が整備された。

- HPPT 皮膚感作性データベースの整理 (データの信頼性の整理を含む)
- HPPT データベースの変動性と不確実性の分析
- GHS 分類に HPPT データを利用するための枠組み
- DASS の予測性検証に用いる参照物質の GHS 分類

本ガイダンスは DASS について皮膚感作性の有害性の有無を判定する観点で解説し留意点等を取りまとめたものであることから、本補遺では以下に、HPPT 皮膚感作性データベースの整理、HPPT データベースの概要、HPPT データベースの変動性と不確実性について概要をまとめる。

2. HPPT 皮膚感作性データベースの整理

2-1. 情報源

HPPT 皮膚感作性データベースは、NICEATM (United States National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) と BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung ([German Federal Institute for Risk Assessment])) によって構築及び検証され、1950 年代後半から 2019 年 12 月までの 1,700 以上の出版物

で言及された 2277 件の HPPT の結果が含まれている。

2-2. 信頼性

データベース化において、HPPT データの信頼性は重要である。大半が 1970 年代や 80 年代に取得されたものであり、特にガイドラインや検証されていないテストプロトコールにて実施された結果や、品質管理が行われていない条件下で実施された結果があること、更にはオリジナルな試験報告書が公開されていないため、公表されている概要のみに頼ることになるなど、データベース化をする上で用いる情報の品質を精査する必要があった。そのため、HDSG では情報の品質を保つうえで、必要な情報としての条件を以下のように定めた。

- 必須情報：一次報告書が明確に識別されており、HMT 又は HRIPT のどちらが実施されたかが明らかであること、物質同定が十分に特徴づけられている、試験で陽性反応が発生したかがわかっている、有効被験者数
- 関連情報：誘導に使用される溶媒、試験濃度、誘導適用時の皮膚面積当たりの濃度、陽性発生率

この概念に従って、HDSG では、相対信頼性スコア（Relative Reliability Score：RRS）を定義し、各文献等を分類した。

表 3-1：Relative Reliability Score (RRS)

分類	内容	例
High relative reliability (RRS = 1)	すべての必須情報及びすべての関連情報は、オリジナルの試験報告書（一次参照、「REF1」と称する）から入手可能 [318 件 (14.0%)]	Kligman (1966c) ²⁾ HMT の概念が紹介され、必要な実験の詳細と、この条件下で得られた多くの結果が提供されている
Sufficiently reliable (RRS = 2)	REF1 には必須情報及び関連情報がすべて含まれているわけではないが、不足している必須情報又は関連情報は REF1 が引用した文献から入手可能 [91 件 (4.1%)]	Greif (1967) ³⁾ Kligman (1966c)で示されたデザインを直接参照
Relatively reliable, with some additional uncertainty (RRS = 3)	REF1 と REF1 が引用した、又は REF1 を引用した文献は、すべての必須情報を含んでいるが、すべての関連情報を含んでいるわけではない。しかし、REF1 にアクセスできる著者の出版物など、さらに利用可能な情報源から、不足している関連	Kligman and Epstein (1975) ⁴⁾ 著者らは 1966 年のアプローチを再検討し、その間に試験設計パラメータをいくつか変更。例えば、試験量とパッチサイズの比率を約 69 μ

	情報をすべて推測することができるが、RRS = 2 と比べると信頼度は低くなる。 [1630 件 (71.6%)]	L/cm2 から 75 μ L/cm2 に変更した。しかし、使用された試験デザインに関しては、1970 年代と 1980 年代の多くの RIFM モノグラフが両方の文献を引用しており、試験容量/パッチサイズの比率は 69 μ L/cm2 又は 75 μ L/cm2 のどちらかであったと推測されるのみ。実用上の理由から、その差は大きくないので、これらのモノグラフに基づく更なる計算には平均値 (72 μ L/cm2) を使用したが、この方法で得られた結果はより高い不確実性を伴う。
Relatively reliable in part (RRS = 4)	REF1 及び REF1 が引用した文献は、すべての必須情報を含んでいるが、すべての関連情報を含んでいるわけではない。さらに、欠落している関連情報のすべてが、さらに利用可能な情報源から推測できるわけではないが (RRS = 3 参照)、最低限、試験濃度 (CONC) 又は投与量 (DSA) のいずれかが利用可能か、推測可能。 [216 件 (9.5%)]	ヘプチン炭酸メチル (CASRN 111-12-6/EC 203-836-6) : HRIPT の結果が公表されているが、試験計画の詳細を報告していない二次資料しか入手できない。使用した試験量とパッチサイズが記載されていないため、皮膚面積あたりの DSA を算出することはできない。しかし、他のデータは提供されているので、陽性の発生率など、この報告書のいくつかの計算を行うことができる。
Not reliable (RRS = 5)	必須情報はすべて揃っているが、CONC も DSA も利用できない。RRS = 5 の検査結果は、本報告書ではさらなる分析から除外。 [22 件 (1.0%)]	Gad ら (1986)⁵⁾ 安息香酸 (CASRN 65-85-0/EC 200-618-2) の HRIPT 結果を否定的に報告しているが、試験濃度や皮膚面積あたりの DSA は示していない。したがって、この物質が強い皮膚感作性 (GHS 1A) であることを少なくとも除外するために、十分に高い試験濃度/DSA が使用されたかどうかを判断不可。

—	必須情報が欠落しているため、あるいは使用された溶媒に表面活性成分、刺激性成分、感作性成分が含まれている可能性があるとして想定される場合、データベースに収録されなかった。 [576 件]	Basketter ら (1999) ⁶⁾ スルファニル酸 (CASRN 121-57-3/EC 204-482-5) はヒトの皮膚感作性物質ではないと報告しているが、引用した HPPT データを含む主要な資料の中に、この物質の結果を含むものはなかった。この (非) 分類が、本当に HMT 又は HPPT の結果まで遡るのかどうかは不明であり、本質的な情報が欠落している。
---	--	--

[データベースに用いた 2,277 件のテスト結果のうちのヒット件数 (%)]

RRS = 5 の検査結果は、試験濃度や投与量が不明確であることから追加分析から除外されており、2021 年 3 月 3 日の時点で、RRS 1 ~ 4 の 2,255 件のテスト結果がさらなる分析のために残されている。個々の HPPT 結果に RRS を割り当てるための決定木を図 3-1 に示す。

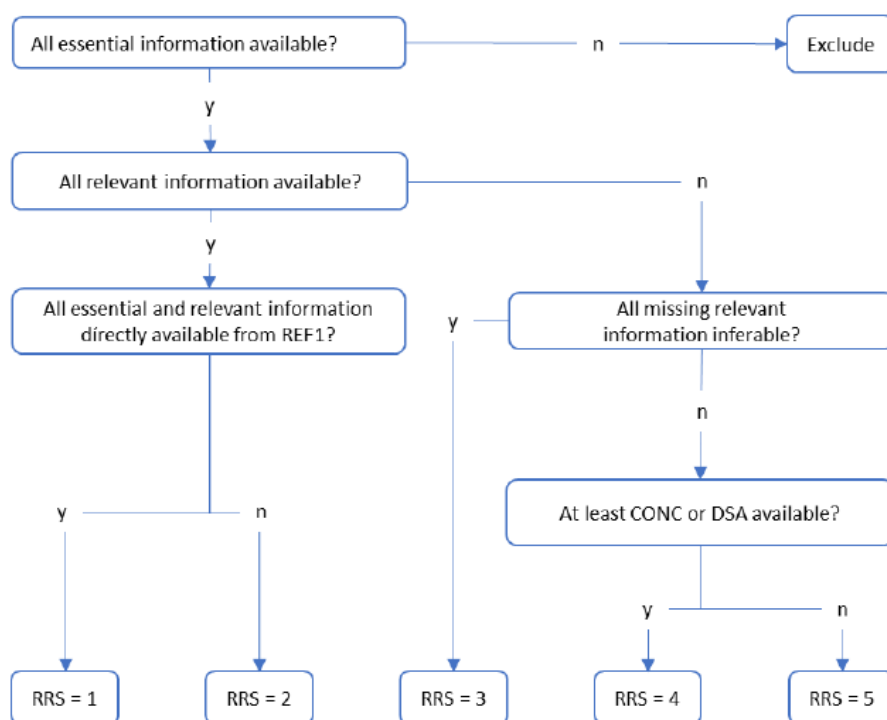


図 3-1：個々の HPPT 結果に RRS を割り当てるための決定木

3. HPPT データベースの概要

RRS < 5 の HPPT データのほとんどが 1970 年代及び 80 年代のものであり、中でも主要な参考資料を入手できたのは、RRD<5 の 2,255 件のうち、わずか 535 件のみであった。

RRS < 5 の HPPT データは、HMT と HRIPT のサブグループに分けられ、HMT もしくは HRIPT のどちらに該当するかが不明確な場合は、除外されている。HMT と HRIPT の試験方法は共通している部分があり、ある濃度で適切な溶媒に溶解もしくは分散させた被験物質をパッチ絆に塗布し、それを手腕もしくは背中に局所的に塗布し、一定回数繰り返し塗布後、10～14 日間の休息期間を経た後に、再度被験物質を貼付し、一定時間後に皮膚反応を評価する。ただし、HRIPT では 50～200 名の被験者が 3 週間にわたって 9 ないし 10 回の誘導曝露を受けるのに対して、HMT では 25 名の被験者に対して 10 日間で 5 回の誘導曝露が行われるのが異なる点である。また、HMT は、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) で事前に前処理をおこないあらかじめ塗布部位を刺激状態にしておくことで、被験者の皮膚透過性と感度を高めているという特徴を有する⁷⁾。

4. HPPT データベースの変動性と不確実性について

HPPT 結果に大きく影響を与える要因には、変動性と不確実性があり、データベースを利用する上で留意する必要がある。なお、現時点では各試験結果の全体的な変動性に対する個々の影響を定量的に評価することはできていないが、引き続き HDSG において検証を実施し、これらの問題に関するレビューが発表される予定である。

➤ 変動性

- ・試験項目や被験物質、用いる溶媒に関する変動性
- ・母集団内及び母集団間の変動性
- ・曝露状態の変動性
- ・スコアの変動性

➤ 不確実性

- ・結果に対して影響を与える可能性のあるすべての関連パラメータが特定され、それらが試験報告書に記載されているかが不明
- ・試験報告書に記載されている試験条件が遵守されていたかが不明
- ・複数の関連パラメータの記述が不明であるため、試験条件が不明
- ・母集団に関する情報が不明

GHS 分類に HPPT データを利用するための枠組みや DASS の予測性検証に用いる参照物質の GHS 分類については、OECD ガイドライン 497 の Annex 4⁸⁾を参照されたい。

5. 引用文献

- 1) OECD (2016): Guidance document on the reporting of defined approaches and individual information to be used within integrated approaches to testing and assessment (IATA) for skin sensitisation. Document no. ENV/JM/MONO(2016)29. Organization for Economic Co-Operation and Development, Paris, France. https://www.oecd-ilibrary.org/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-sensitisation_5jfrvgk27bmx.pdf?itemId=%2Fcontent%2Fpublication%2F9789264279285-en&mimeType=pdf (last accessed 2025-03-19)
- 2) Kligman A.M. (1966): The identification of contact allergens by human assay: III. The maximization test: A procedure for screening and rating contact sensitizers. *Journal of Investigative Dermatology* 47 (5), 393-409. DOI: 10.1038/jid.1966.160
- 3) Greif N. (1967): Cutaneous safety of fragrance material as measured by the maximization test. *American Perfumer and Cosmetics* 82, 54-57
- 4) Kligman A.M. and Epstein W. (1975): Updating the maximization test for identifying contact allergens. *Contact Dermatitis* 1 (4), 231-239. DOI: 10.1111/j.1600-0536.1975.tb05389.x
- 5) Gad S.C. et al. (1986): Development and validation of an alternative dermal sensitization test: The mouse ear swelling test (MEST). *Toxicology and Applied Pharmacology* 84 (1), 93-114. DOI: 10.1016/0041-008X(86)90419-9 (last accessed 2025-03-19)
- 6) Basketter D.A. et al. (1999): Threshold for classification as a skin sensitizer in the local lymph node assay: A statistical evaluation. *Food and Chemical Toxicology* 37 (12), 1167-1174. DOI: 10.1016/S0278-6915(99)00112-X
- 7) Kligman A.M. (1966): The identification of contact allergens by human assay: III. The maximization test: A procedure for screening and rating contact sensitizers. *Journal of Investigative Dermatology* 47 (5), 393-409. DOI: 10.1038/jid.1966.160
- 8) OECD (2021), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 497, Annex 4: Report of the Human Data Sub-Group on the Curation and Evaluation of the Human Reference Data

and the Derivation of Associated Substance Classifications. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at:
[https://one.oecd.org/document/ENV/CBC/MONO\(2021\)11/ann4/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/CBC/MONO(2021)11/ann4/en/pdf)

補遺 5 一般社団法人 SSCI-Net (Skin Safety Case Information Network：皮膚 安全性症例情報ネット)

一般社団法人 SSCI-Net は、国民の化粧品等による皮膚障害被害を早期に発見し最小化を図るとともに、本邦をより安全・安心な国にすることを目指して設立された。リスクの早期発見による迅速な対応と製品の皮膚に対する安全性向上を、社会全体で進めることを可能とするため、パッチテスト等により一定の精度をもった皮膚症例情報を収集し、それを産学官で共有し迅速に検討をし、最適な対応に導くという「皮膚の安全性を向上させるネットワーク」として 2016 年より活動が開始され、具体的には、下記を主な取り組み内容として活動している。(参考：<http://info.sscinet.or.jp/activities.html>)

- 臨床医による皮膚健康障害症例報告の収集
- 化粧品メーカー等との連携による障害の原因精査を目的とした臨床研究支援
- 収集された症例、及び関係する臨床研究結果の、関係省庁及びメーカーへの情報フィードバック
- 皮膚健康障害の原因候補物質に関する臨床研究支援
- 上記事業に付帯又は関連する事業