

令和8年1月9日
独立行政法人製品評価技術基盤機構

令和7年度QSAR/リードアクロス講習会

皮膚感作性試験代替法の概要・最新動向



山陽小野田市立山口東京理科大学工学部

小島 肇

発表時の開示 (申告すべき**COI**状態がある場合)

CO I 開示

発表者名： 小島 肇^{1,2,3}

1:山陽小野田市立山口東京理科大学 工学部

2:国立医薬品食品衛生研究所

3:一般財団法人 食品薬品安全センター

演題発表内容に関連し、発表者の開示すべき利益相反はありません。

本発表内容は、所轄の厚生労働省の行政施策を代表するものでも、それにより制約されるものでもありません



工学部 Faculty of Engineering

医薬工学科

Department of
Pharmaceutical Engineering

学校の詳細はこちら



ライフサイエンスと
データサイエンスの
両方に精通した人材を育成。

学びのポイント

医薬工学は、バイオ医薬品・医療機器、
化粧品・食品に関する製造技術及びプロセス、
製品の品質評価・品質保証を学ぶ学問です。
医薬工学科では、ライフサイエンスと
データサイエンスの両方に精通し、
バイオテクノロジーによるバイオ医薬品や、
人の心を豊かにする化粧品・
機能性食品を開発する
人材を養成します。



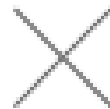
公立大学法人 山陽小野田市立
山口東京理科大学
Sanyo-Onoda City University

医薬工学科の教育内容

学びの領域 01

医薬品・
医療機器分野

医薬品・医療機器開発に関するライフサイエンスとデータサイエンスの両方の知識と研究心(研究能力)を身につけ、製造技術及びプロセス開発に関する問題発見・解決能力を身につけます。



学びの領域 02

化粧品・
食品分野

化粧品・食品に関するライフサイエンスとデータサイエンスの両方の知識と研究心(研究能力)を身につけ、製造品の品質評価・品質保証に関する問題発見・解決能力を身につけます。

品質保証

講演内容

- OECD TGの現状
- OECD における皮膚感作性試験の現状
- OECDガイドライン497
- 国内規制の動向

OECD

Organisation for Economic Co-operation and Development :
経済協力開発機構

現在の加盟国：38カ国

EU加盟国22カ国、その他16カ国（日米英、他）

— OECD の役割

OECDのアプローチについて詳しく見る



基準の設定と 政策支援

OECDは、加盟国、パートナー諸国に国際基準の策定を奨励し、誰もが同じルールに従って行動し、協力して共通の目標を達成できるよう支援しています。



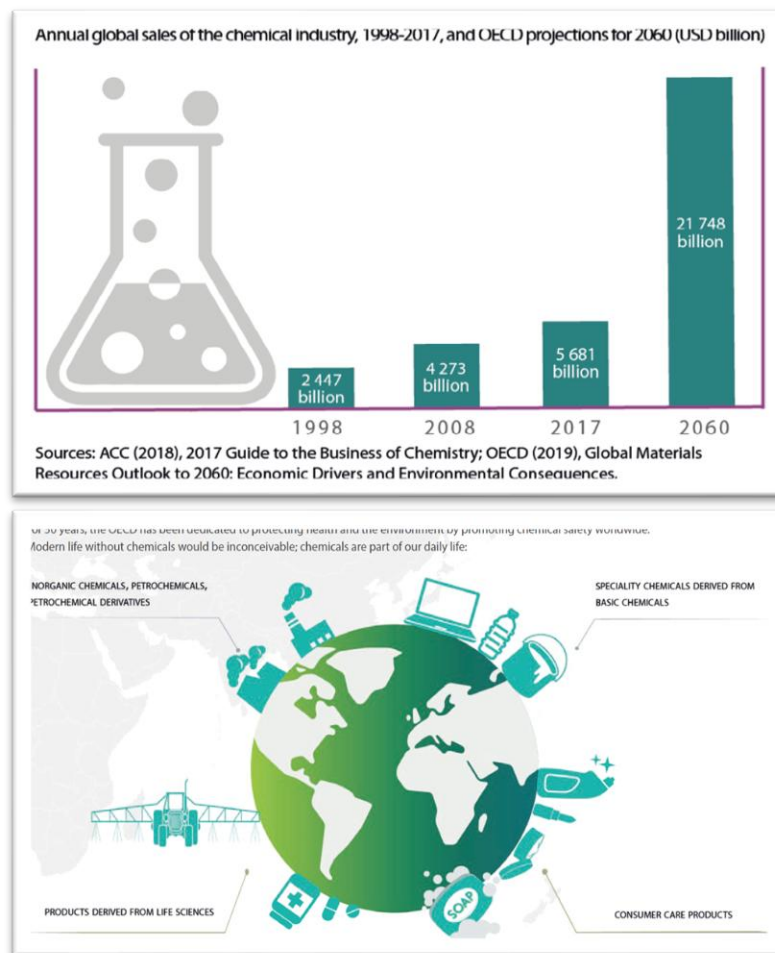
<https://www.oecd.org/ja/about/how-we-work/>

平林容子 安全性生物試験研究センター長より借用

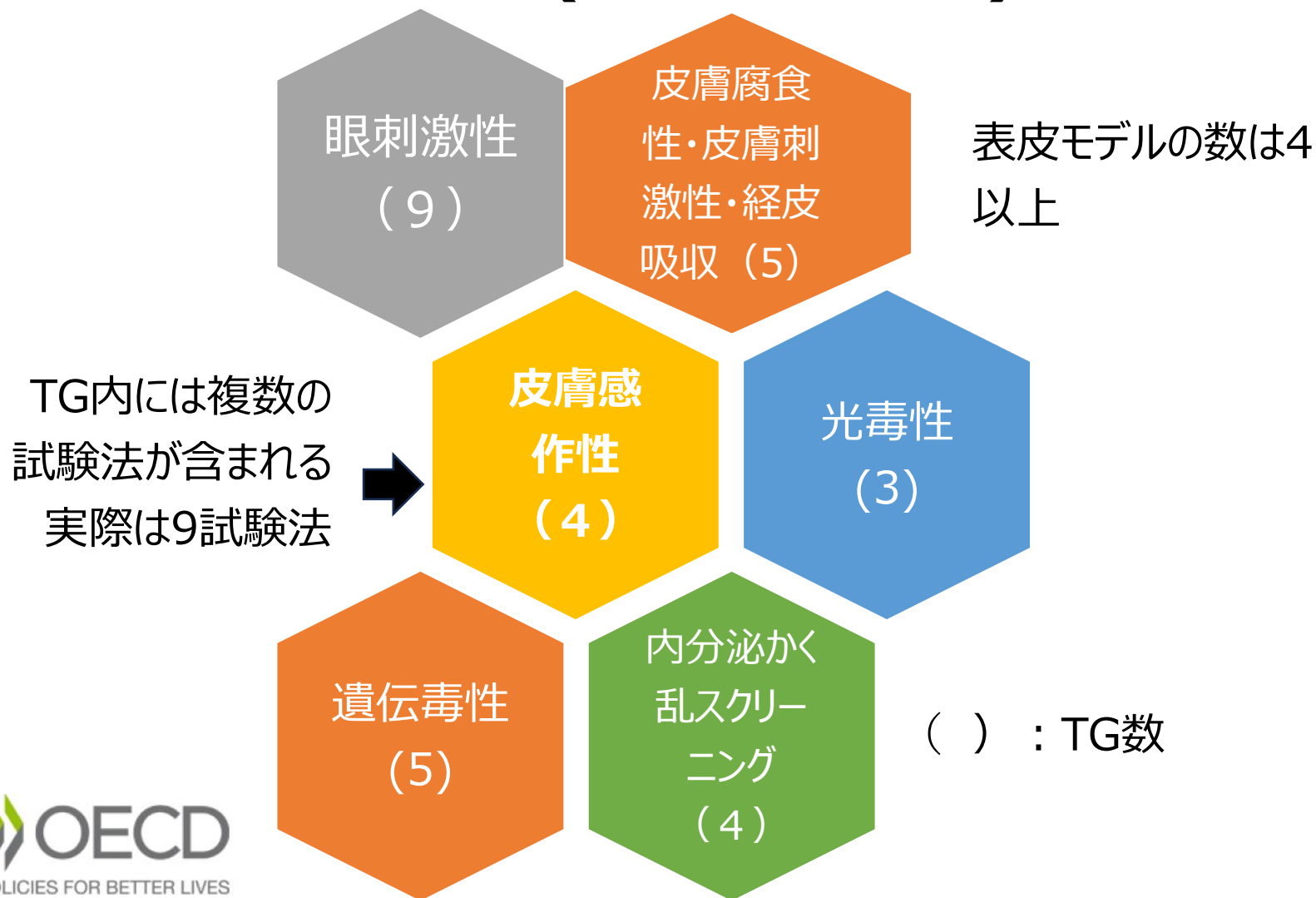
OECDにおける化学物質の安全性評価への取組



<https://www.oecd.org/env/ehs/work-on-chemical-safety-and-biosafety-2021-24.pdf>



代替法が関係したOECDのヒト健康に関する TG (2025年現在)



OECD テストガイドライン ヒト健康に関する TGと動物実験を用いない試験法の割合（2025）

分類	TG数	<i>in vitro, in chemico</i> のTG数
腐食性	3	3
皮膚刺激性	2	1
光毒性	3	3
眼刺激性	10	9

全身毒性試験の代替法は免疫毒性試験しかない

経皮吸収	2	1
遺伝毒性	13	5
内分泌かく乱	6	4
その他	29	1
合計	76	31

40%越え達成！

日本人が開発した代替法のTG

分類	<i>in vitro, in chemico</i> のTG数	日本人が標準化した試験法数
腐食性	3	1
皮膚刺激性	1	1
光毒性	3	1
眼刺激性	9	3
皮膚感作性	4	4
経皮吸収	1	0
遺伝毒性	5	0
内分泌かく乱	4	3
その他	1	1
合計	31	14

動物実験代替法(置き換え) が関係したOECDのヒト健康に関するTG(2025)










TG No.	TG名称
皮膚腐食性試験 (3試験法, TG431には5表皮モデルが含まれる)	
430	<i>In vitro</i> 皮膚腐食性：経皮電気抵抗試験 (TER)
431	<i>In vitro</i> 皮膚腐食性：ヒト表皮モデル試験
435	皮膚腐食性評価のための <i>in vitro</i> 膜バリア試験法
皮膚刺激性試験 (1試験法, TG439には6表皮モデルが含まれる)	
439	<i>In vitro</i> 皮膚刺激性：再構築ヒト表皮試験法
光毒性試験 (2試験法)	
432	<i>In vitro</i> 3T3 NRU光毒性試験
495	ROSアッセイ
498	再構築表皮モデル
眼刺激性試験 (7試験法, TG492には4モデルが含まれる)	
437	i) 眼に対する重篤な損傷性を引き起こす化学品、およびii) 眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性に分類する必要のない化学品を同定するための、ウシ角膜を用いる混濁度および透過性試験法
438	i) 眼に対する重篤な損傷性を引き起こす化学品、およびii) 眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性に分類する必要のない化学品を同定するための、ニワトリ摘出眼球を用いる試験法
460	眼腐食性物質および眼に対する重篤な刺激性物質を同定するためのフルオレセイン漏出試験法
467	眼刺激性Defined approach
491	i) 眼に対する重篤な損傷性を引き起こす化学品、およびii) 眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性に分類する必要のない化学品を同定するための、 <i>in vitro</i> 短時間曝露法
492	眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性に分類する必要のない化学品を同定するための、再構築ヒト角膜試験法
492b	有害性同定のための再構築ヒト角膜試験法
494	Vitrigel-EIT
496	Macromoleculr test

赤字：日本で開発された方法

動物実験代替法(置き換え)が関係したOECDのヒト健康に関するTG(2025)

TG No.	TG名称
皮膚感作性試験 (計9試験法)	
442C	<i>In Chemico</i> 皮膚感作性：ペプチド結合性試験 (ADRA, DPRA, kDPRA)
442D	<i>In vitro</i> 皮膚感作性：角化細胞株レポーターアッセイ (KeratiNoSens, LuSens, EpiSensA)
442E	<i>In vitro</i> 皮膚感作性：ヒト細胞株活性試験 (h-CLAT, U-SENS, IL-8 Luc assay、GARD™Skin)
497	皮膚感作性Defined approach
内分泌スクリーニング (7試験法, TG455には3つの試験法、TG493には2試験法が含まれる)	
455	性能基準TG 化学物質のエストロゲンアゴニスト活性の検出を目的とした、安定に形質移入されたヒトエストロゲン受容体- α の転写活性化 (STTA)試験
456	H295R細胞ステロイド生合成アッセイ法
458	アンドロゲン受容体 (AR) 作動・拮抗剤検出安定トランスフェクトトランス活性化 (STTA) 試験
493	性能基準TG 化学物質のヒト組み換えエストロゲンレセプター(hrER) <i>in vitro</i> 法 ER 結合アフィニティ
遺伝毒性試験 (5試験法)	
471	細菌復帰突然変異試験
473	哺乳類細胞を用いた <i>in vitro</i> 染色体異常試験
476	Hprt遺伝子とxpprt遺伝子を用いる哺乳類細胞の <i>in vitro</i> 遺伝子突然変異試験
487	哺乳類細胞を用いた <i>in vitro</i> 小核試験
490	チミジンキナーゼ遺伝子を用いた哺乳類細胞の <i>in vitro</i> 遺伝子突然変異試験
経皮吸収試験 (1試験法)	
428	<i>In vitro</i> 皮膚吸収試験法
免疫毒性試験 (1試験法)	
444A	IL-2 Luc assay & IL-2 Luc LTT

GHSのシンボルと名称

炎	円上の炎	爆弾の爆発
		
腐食性	ガスボンベ	どくろ
		
感嘆符	環境	健康有害性
		

OECDのTGはGHSのラベリングに貢献

小括

- OECDにおける代替法の数は年々増しており、ヒト健康に関するTGのうち、4割を超える程多くなった。
- 昨今、TG開発はGHS分類への貢献が重視されるが、本分類に寄与できる試験法の数は限られている。代替法としては、局所毒性試験法が多い。
- ちなみに、TG開発における日本の貢献度は高い。

OECD における皮膚感作性試験の現状

代表的な皮膚感作性物質

分類	物質名
医薬品(抗生物質など)	2,4-ジニトロクロロベンゼン，ネオマイシン，スルホンアミド，ゼンゾカインなど
防腐剤	フォルムアルデヒド，イミダゾリウムウレアなど
香料	オイゲノール，イソオイゲノール，桂皮酸アルデヒド，ベンジルサリチル酸，シトラールなど
植物・樹木	ペルーバルサム，ロジン，漆，サクラソウなど
消毒剤	クロロヘキシジン，ヘキサクロロフェンなど
ラバー製品	P-フェニレンジアミン，メルカプトベンゾチアゾール，ハイドロキノンなど
皮革	フォルムアルデヒド，グルタルアルデヒドなど
接着剤	ビスフェノールA/エピクロロヒドリン，エポキシ樹脂など
金属	ニッケル，コバルト，クロム，金など

我が国の標準アレルゲンにおける陽性率 (2022年)

順位	アレルゲン	分類	割合 (%)
1	金チオ硫酸ナトリウム	金属	25.1
2	硫酸ニッケル	金属	23.7
3	塩化コバルト	金属	8.4
4	p-フェニレンジアミン	化粧品	7.0
5	ウルシオール	植物由来	6.3
6	カルバ混合物	ゴム添加物	5.5
7	香料混合物	化粧品	4.4
8	p-ter-ブチルフェノールホルムアルデヒド 樹脂	樹脂	4.0
9	チラム混合物	ゴム添加物	3.4
10	塩化第二水銀	金属	3.1
11	フラジオマイシン硫酸塩	医薬品	3.1

2022年の平均3%以上のアレルゲンを記載した。

関東裕実：Cosmetic Sciences、2024.10、p67

皮膚感作性試験に関するTG(2025)

TG No.	TG名称
皮膚感作性試験 (計8TG)	
406	<u>Skin Sensitisation</u>
429	Skin Sensitization, <i>Local Lymph Node Assay</i> :
442A	Skin Sensitization, <i>Local Lymph Node Assay: DA</i>
442B	<u>Skin Sensitisation</u> , <i>Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or -FCM</i>
442C	<i>In Chemico</i> 皮膚感作性：ペプチド結合性試験 (ADRA, DPRA, kDPRA)
442D	<i>In vitro</i> 皮膚感作性：角化細胞株を用いるアッセイ (KeratinoSens, LuSens, EpiSensA)
442E	<i>In vitro</i> 皮膚感作性：ヒト細胞株活性試験 (h-CLAT, U-SENS, IL-8 Luc assay, GARD™Skin)
497	<u>Defined Approaches on Skin Sensitisation</u>

TG442～442E単独では評価できない。



Section 4
Health effects

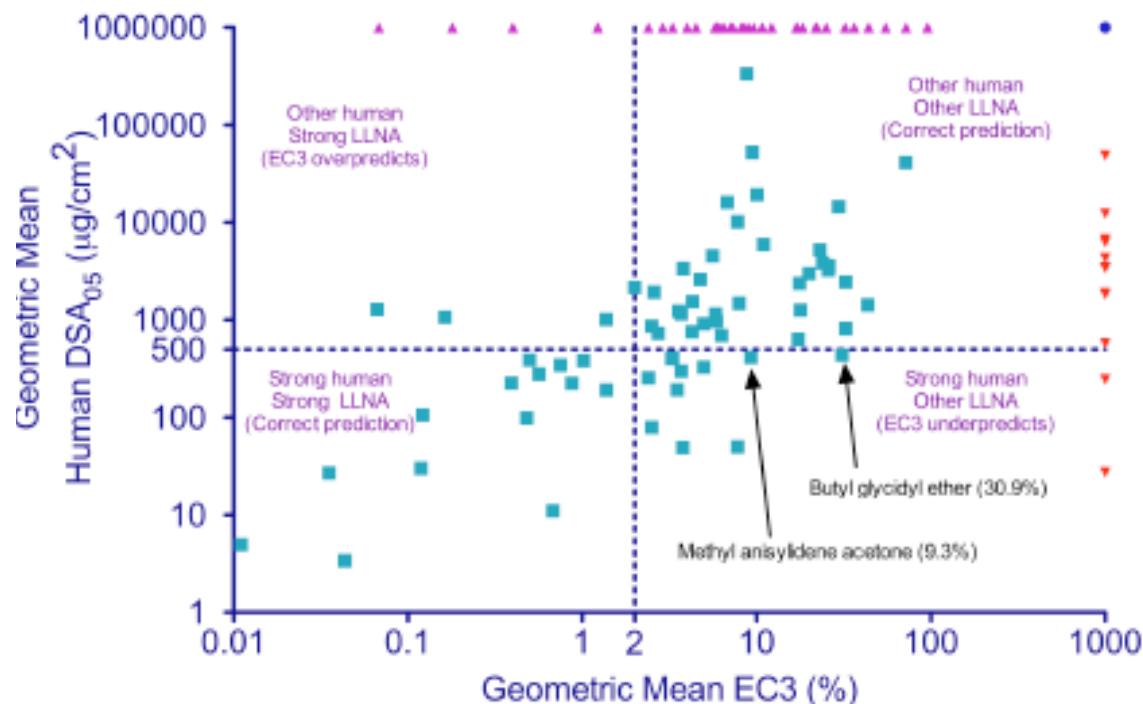
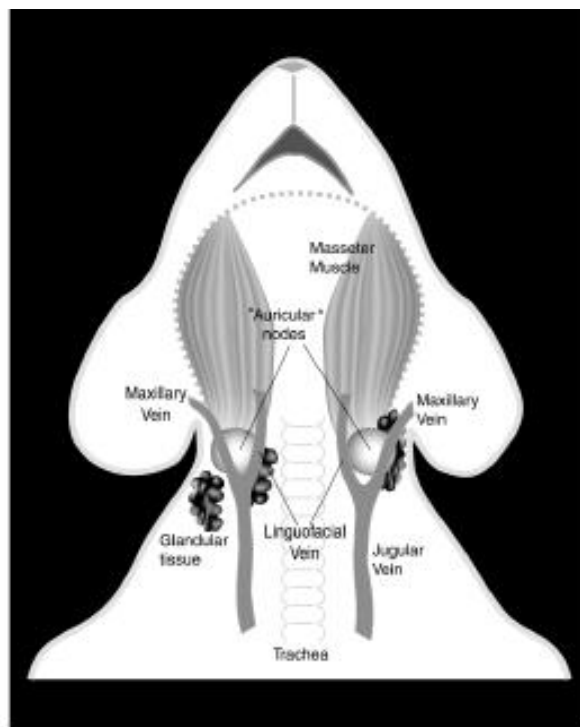
Test Guideline No. 406
Skin Sensitisation



- ・ビューラー試験とMaximization試験（GPMT）の2試験が記載されている。
- ・これまでの検討されてきた方法（4つのアジュバントと用いる方法と3つの非アジュバント法）が否定されるものではない。
- ・動物福祉の観点から、本TGが使われるのは、他の皮膚感作性試験ができない場合の最後の頼みの綱である。
- ・ビューラー試験はGPMTより感度が低い。感作性の検出は評価できるが、定量的な検出には限度がある。

LLNA : TG429

Figure 3-1 LLNA EC3 and Human Results by GHS Potency Category for 136 Substances

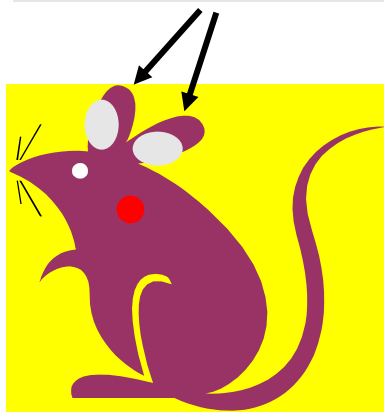


Legend: ■ Human/LLNA sensitizers (n = 63); ▲ LLNA false positive (n = 35); ▼ LLNA false negative (n = 13); ● Concordant negative (n = 25).

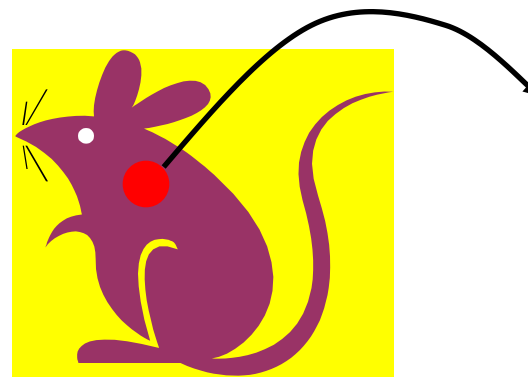
Abbreviations: DSA_{0.5} = induction dose per skin area, in µg/cm², in a human repeat-insult patch test or human maximization test that produces a positive response in 5% of the tested population; EC3 = estimated concentration of a substance expected to produce a stimulation index of 3, the threshold value for a substance to be considered a sensitizer in the LLNA; GHS = Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN 2009); LLNA = murine local lymph node assay.

LLNA-DA

1、 2、 3、 7 days: Chemical application on both ears
Expose 1 day ago: 1% SLS solution application



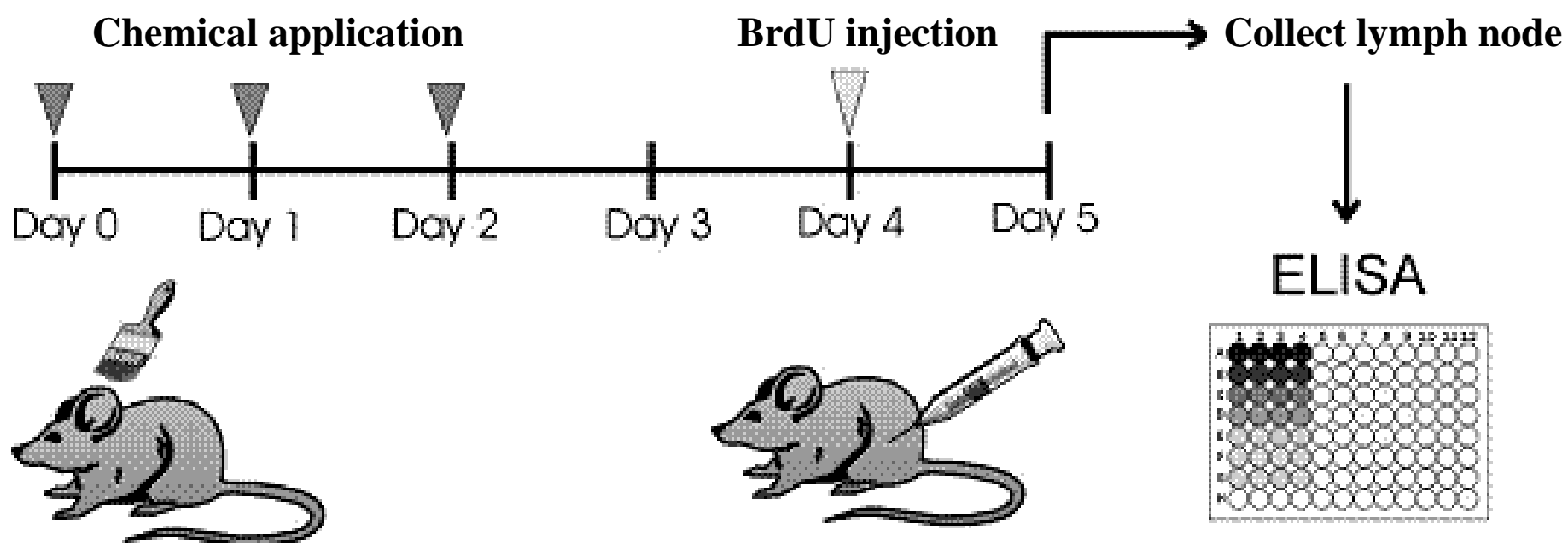
Mouse CBA/JN ♀ 8~12w



8day: Collect lymph node
ATP measurement

This assay was accepted in TG442A

LLNA-BrdU: ELISA



This assay was accepted in TG442B

Historical Accuracy of Animal Tests Against Human Data

LLNA



Hazard Potency (GHS)

72%-82% 54% - 60%

GPMT / Buehler

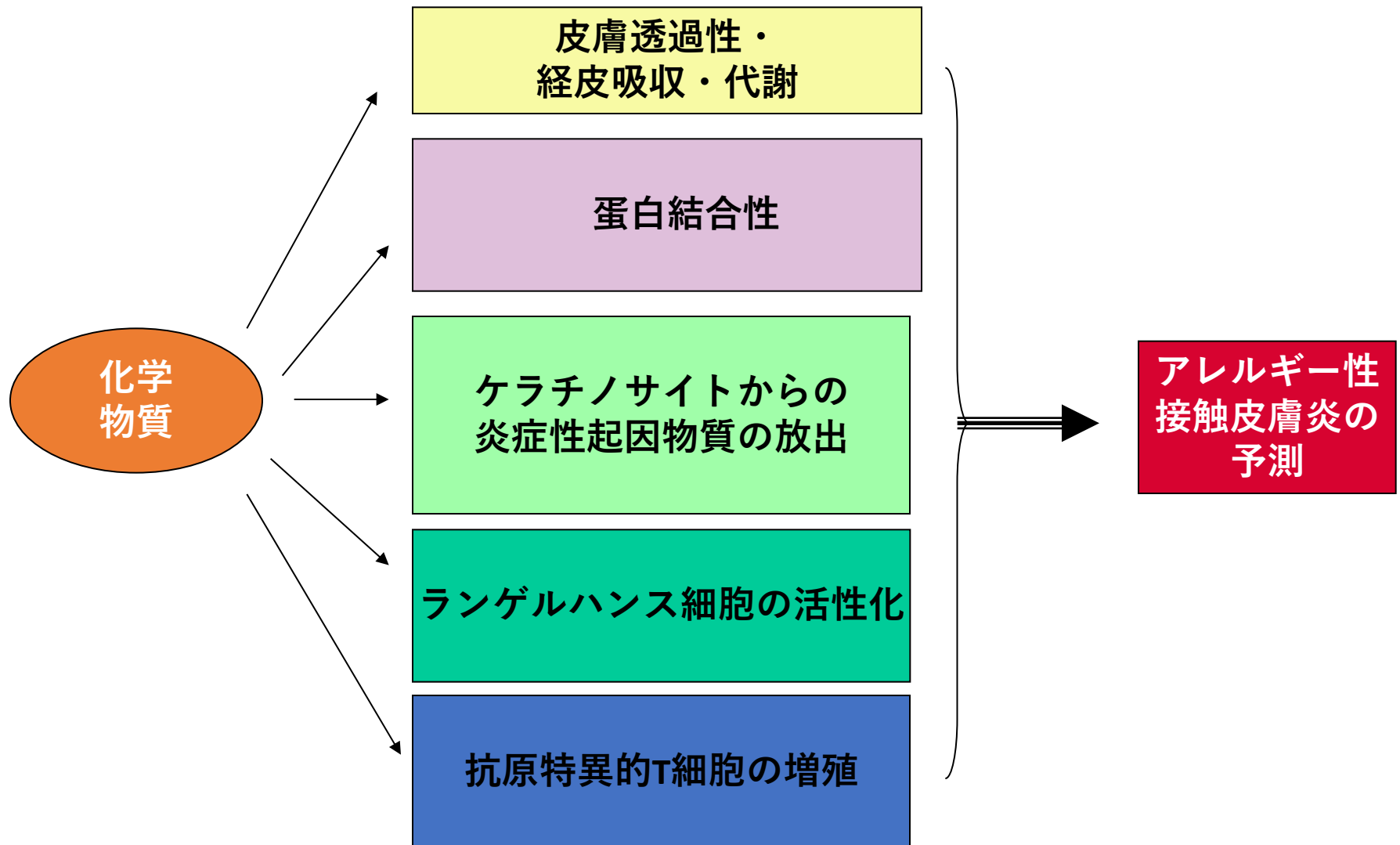


Hazard Potency (GHS)

~72% ~60%

ICCVAM. 1999. NIH Publication No. 99-4494
ICCVAM. 2010. NIH Publication No. 11-7709
Urbisch et al. 2015. Reg Tox Pharm 71:337-351.
Hoffmann et al. 2017 in preparation

アレルギー性接触皮膚炎の感作誘導において重要な作用機構



皮膚感作性におけるAOPダイアグラム

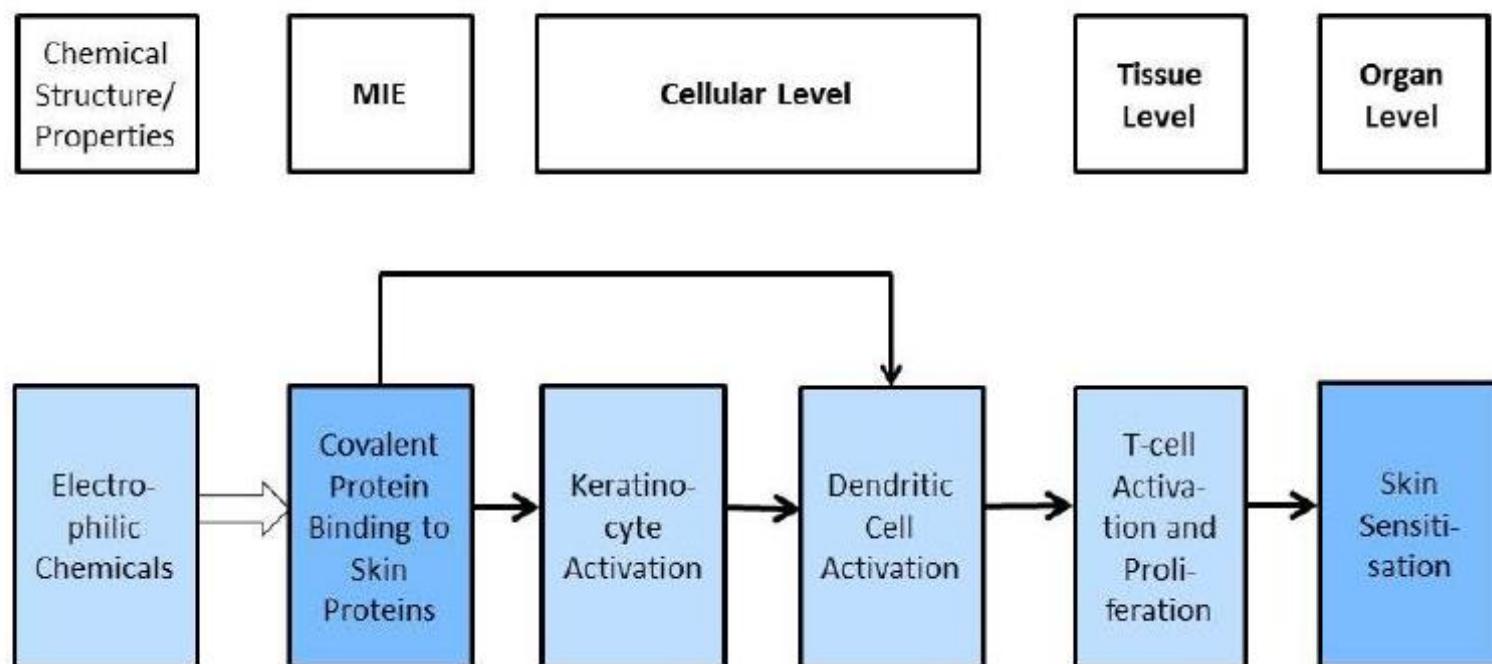
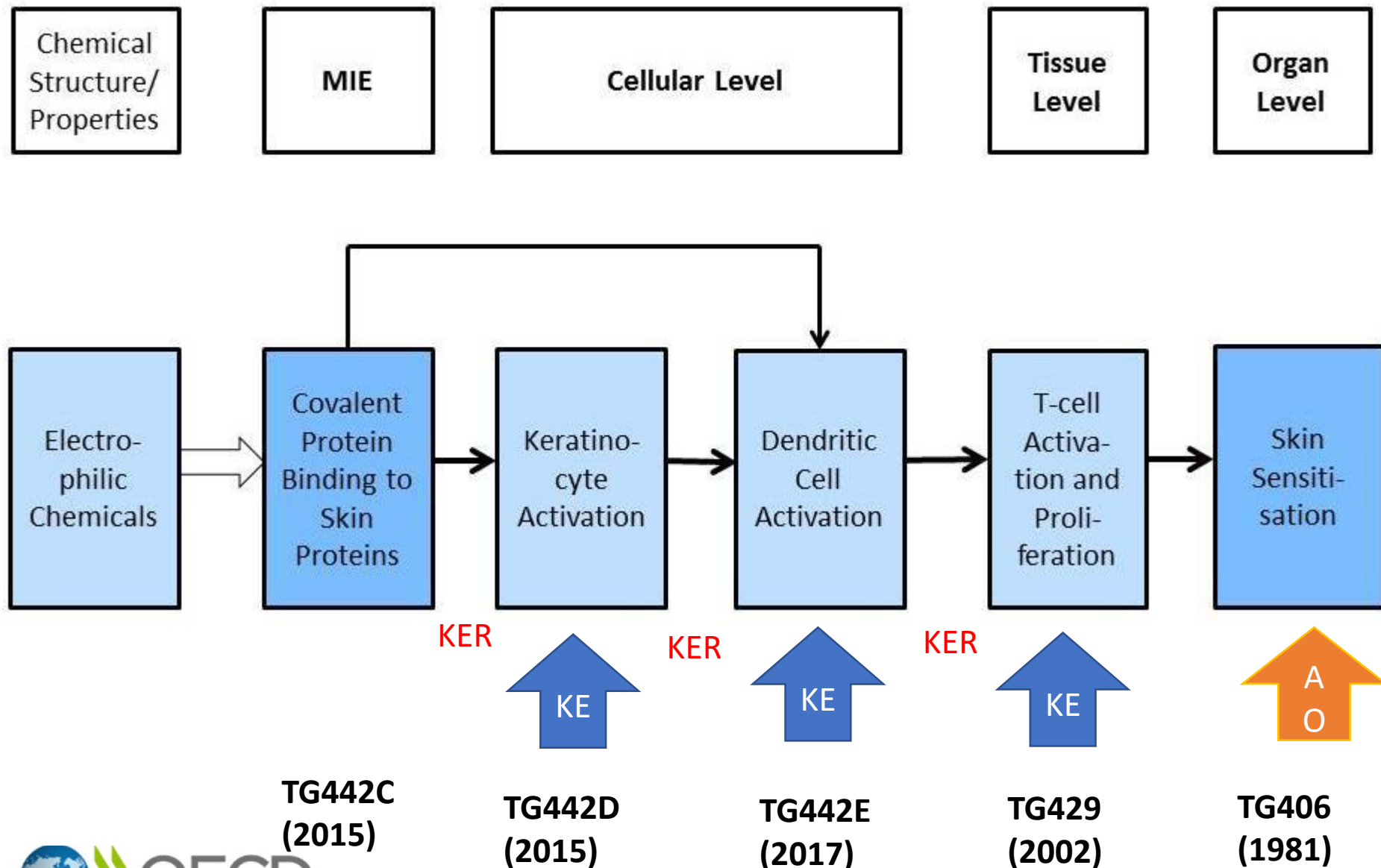
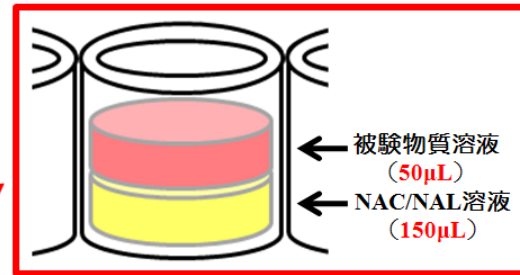
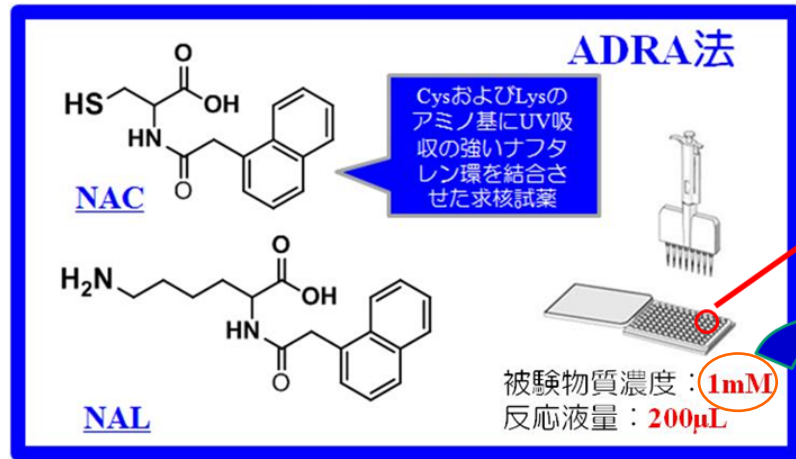


Figure 1: Flow diagram of the pathways and the intermediate steps associated with skin sensitisation (adapted from OECD, 2012a).

OECDにおける皮膚感作性のAOP(2012)とTGs

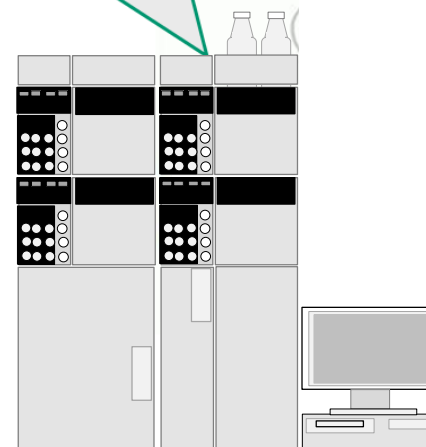
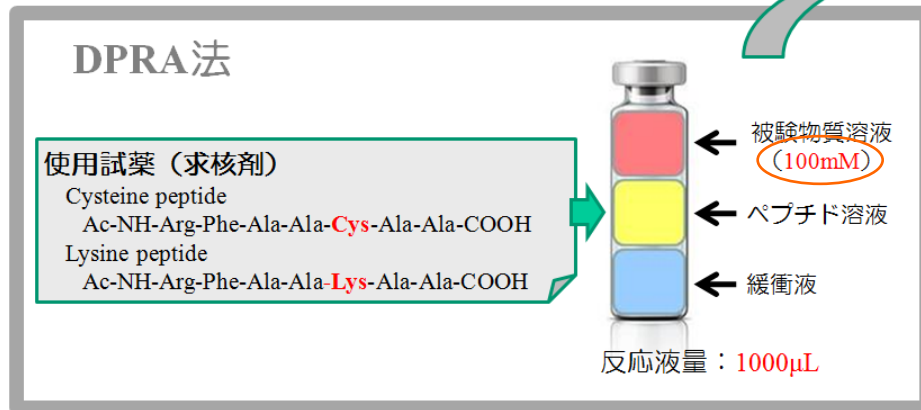


ADRA: Amino acid Derivative Reactivity Assay
DPRA: Direct Peptide Reactivity Assay



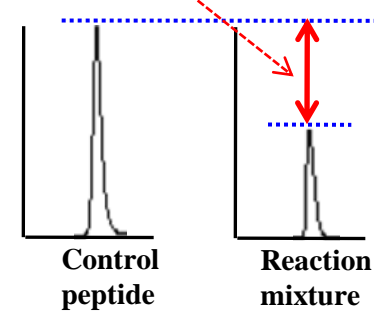
反応停止液
50μL

攪拌後
24時間反応
(25°C)



データ解析

Depletion

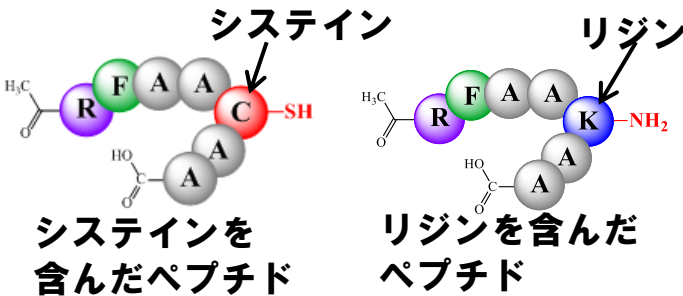
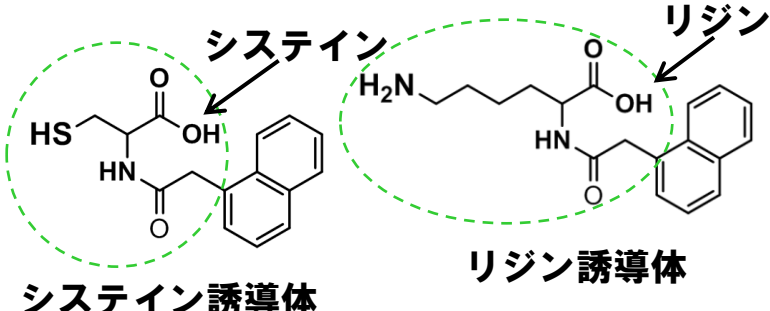


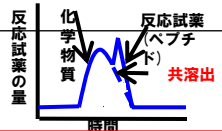
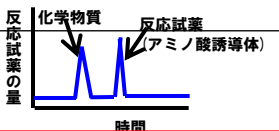


ADRA

検出波長
吸光: 281 nm
蛍光: 284/333 nm
クライテリア
Mean Depletion: 4.9%

DPRA

検出波長
吸光: 220 nm
クライテリア
Mean Depletion: 6.38%

	DPRA(P&G)	ADRA(富士フイルム)
反応試薬	 <p>システインを含んだペプチド</p> <p>リジンを含んだペプチド</p> <p>感受性を持つ化学物質がペプチドを構成するアミノ酸のシステインまたはリジンと結合することを利用した反応試薬。</p>	 <p>システイン誘導体</p> <p>リジン誘導体</p> <p>富士フイルムの高度な化学合成力・分子設計力により開発した反応試薬。紫外線による高感度検出が可能なナフタレン環にシステインあるいはリジンを結合したアミノ酸誘導体を用いる。</p>
化学物質の溶液濃度	100mM	約1/100の量 → 1mM (or 4 mM→1/25)
測定波長	220nm	約1/100の濃度 → 281nm
反応液中での化学物質の析出	多発 	高感度な検出が可能 
共溶出 (化学物質と求核試薬のピークの重なり)	多発 	化学物質と反応試薬のピーク分離 
重量濃度測定	?	可能 (0.5 mg/mL)
蛍光検出	不可能	可能 (蛍光検出器)

混合物測定は、多くのユーザーからの要望

測定項目の追加

混合物の測定が可能 (OECD TG442Cの変更 承認)

重量濃度法とモル濃度法（従来法）の比較

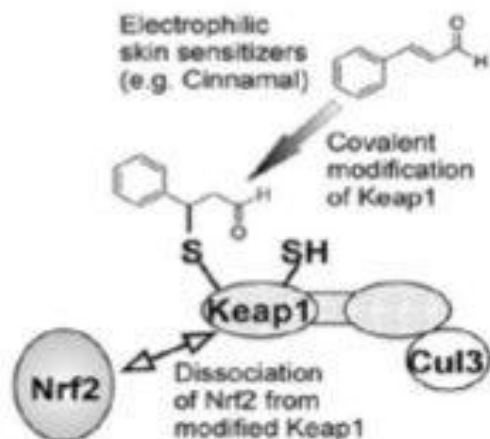
－ 82物質の感作性予測精度 －

		ADRA			DPRA								
		0.5 mg/ml			1 mM ¹			100 mM ²					
		<i>Predicted classification</i>				<i>Predicted classification</i>			<i>Predicted classification</i>				
		S	NS	total		S	NS	total		S	NS	total	
<i>Chemical Classification</i> ^a	S	47	6	53		43	10	53		46	7	53	
	NS	4	25	29		1	28	29		3	25	28	
	total	51	31	82		44	38	82		49	32	81	
sensitivity:		88.7%			sensitivity:		81.1%			sensitivity:		86.8%	
specificity:		86.2%			specificity:		96.6%			specificity:		89.3%	
positive predictivity:		92.2%			positive predictivity:		97.7%			positive predictivity:		93.9%	
negative predictivity:		80.6%			negative predictivity:		73.7%			negative predictivity:		78.1%	
accuracy:		87.8%			accuracy:		86.6%			accuracy:		87.7%	

^aBased primarily on LLNA data

1: Data cited from depletion of NAC and NAL (Fujita et al., 2019), 2: Data cited from depletion of cysteine peptide and lysine peptide (Gerberick et al., 2007)

The KeratinoSens™ assay



Mechanistic basis: addresses responses in keratinocytes (key event 2 of the skin sensitisation AOP) by measuring activation of the antioxidant/electrophile response element-dependent pathway (Keap1-Nrf2-ARE)

Test system: human keratinocyte-derived cell line with a stable insertion of a luciferase gene under the control of an ARE element

Endpoints measured: luciferase gene fold induction and cytotoxicity (MTT assay)

Protocol: Cells exposed for 48h to 12 concentrations of test chemical (dose-response information). Luciferase fold induction relative to induction in vehicle controls quantified by luminescence analysis

Controls: positive (cinnamic aldehyde), negative (DMSO used as vehicle)

皮膚感作性試験代替法EpiSensaA

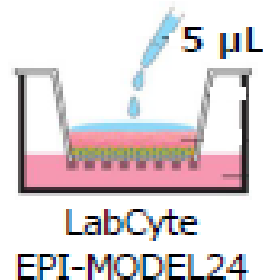
EpiSensaA (Epidermal Sensitization Assay)

Saito et al., Toxicol. In Vitro 2017

- Vehicle : Acetone:Olive oil = 4:1(AOO), Distilled water(DW), 50%EtOH
 - selection criteria : a chemical is soluble at highest concentration
 - selection priority : AOO \Rightarrow DW \Rightarrow 50%EtOH
- Max. applied concentrations. : Solid; 50(w/v)%, liquid; neat
- Min. applied concentration : 0.02%

Chemical exposure

- 2-fold serial dilution
- 3 wells/group, 1 run



6 h

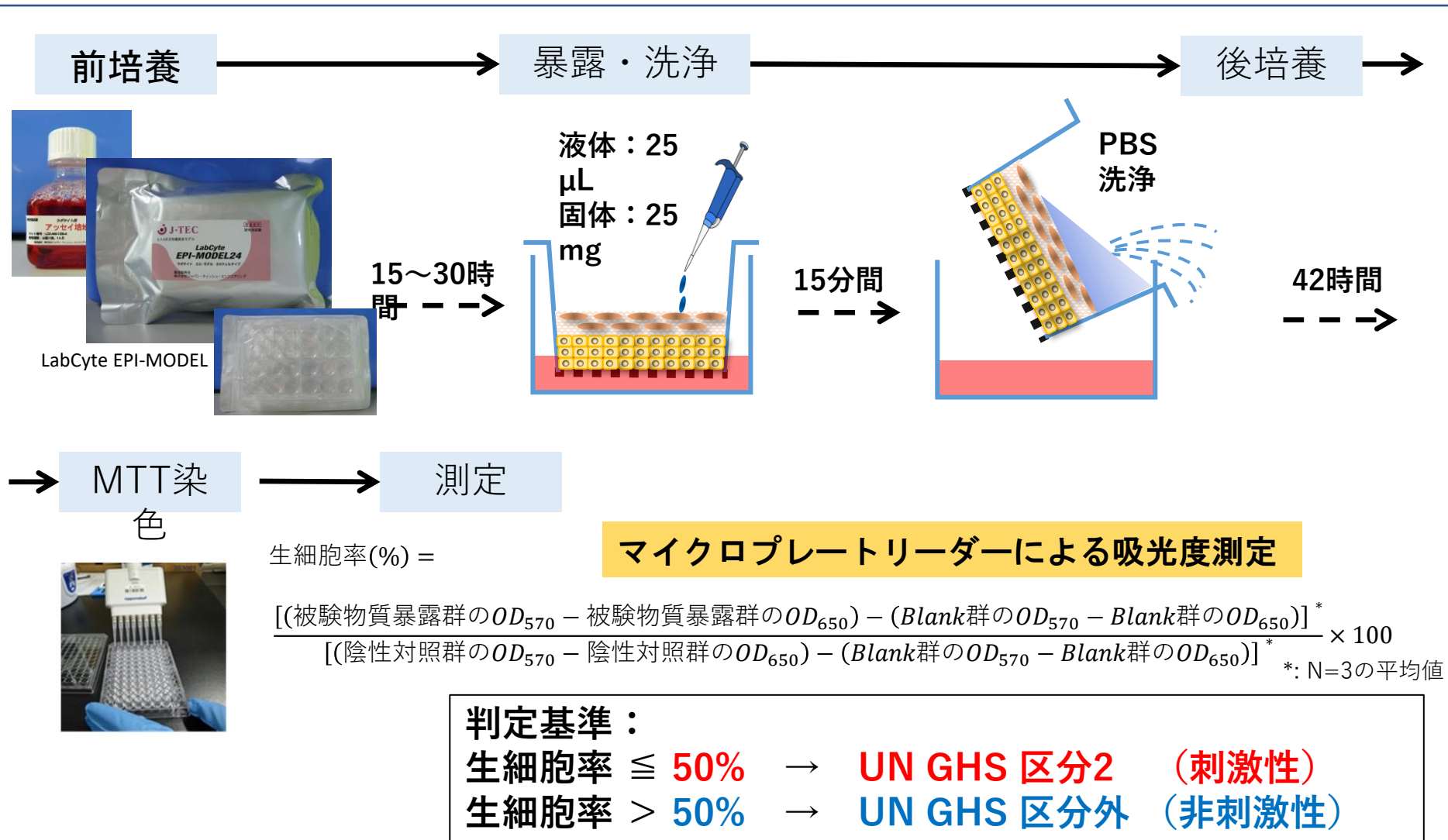
Gene expression (Real-time PCR)

Cell viability (LDH assay)

皮膚刺激性試験代替法プロトコル



試験手順





新規試験法: Epidermal Sensitization assay (EpiSensA) の概要

EpiSensAでは、感作誘導時に起こる3つのキーイベント(経皮吸収、タンパク質との結合、角化細胞の応答)を反映可能な再構築ヒト表皮モデル(RhEモデル)を用いる。また、皮膚感作特異的なバイオマーカーとして、感作初期に誘導される2つの角化細胞応答(炎症反応および細胞防御)と関連した、4つの遺伝子(ATF3、IL-8、DNAJB4およびGCLM)を用いる。なお、図中*で示したATF3、DNAJB4およびGCLMは、本研究で新たに見出したマーカー遺伝子である。

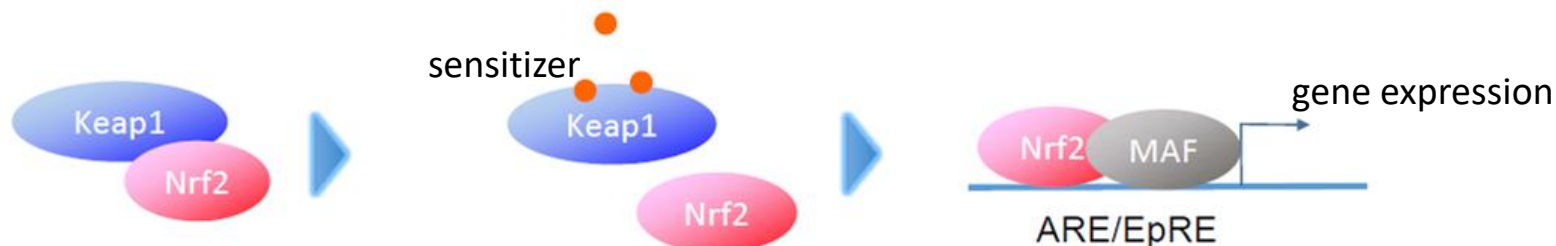
α -Sens[®] as FBS-free test system for detecting Key Event 2 (ARE-Nrf2 activation) of skin sensitization

- ▶ α -Sens[®] is a me-too assay for OECD TG442D: *In Vitro* Skin Sensitisation.

ARE-Nrf2 Luciferase Test

Method.

- ▶ α -Sens[®] is an assay to measures transactivation mediated by Anti-oxidant Responsive Element (ARE) induced by chemicals.

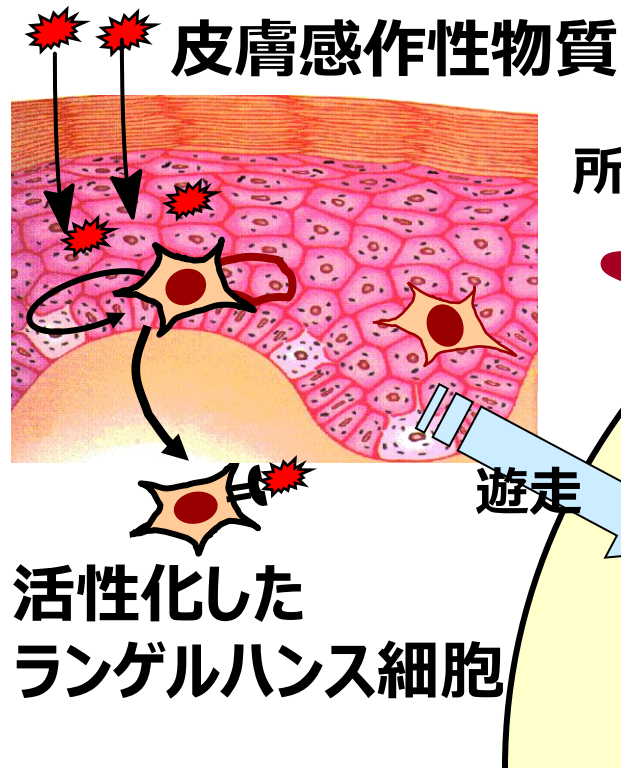


- ▶ *Existing methods in TG442D: KeratinoSensTM (KS), LuSens*
- ▶ **Motives to develop α -Sens[®]**

- Avoid to the use of FBS for animal welfare consideration
- Streamlining to reduce assay resources
- Reduce false negatives/positives

皮膚感作性試験h-CLATの原理

感作誘導過程



所属リンパ節

活性化に伴う発現変化

表面抗原

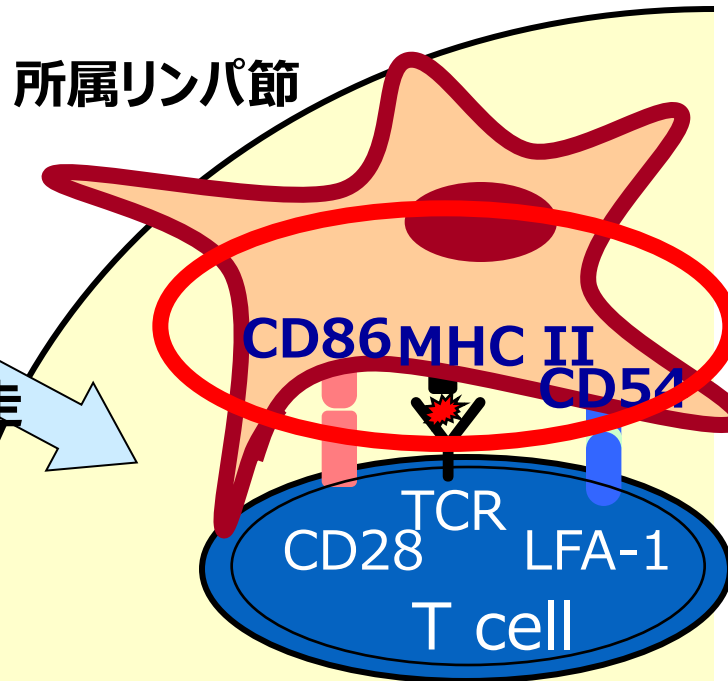
MHC classII
CD86, CD54,
CXCR4, CCR7等

サイトカイン

TNF-a, IL-1b,
CXCL8, MIP-1b等

その他

Notch3, SLAM,
BMP6等

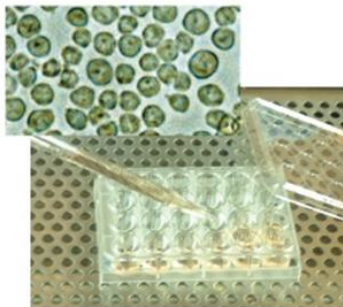


測定指標として、樹状細胞抗原提示に関わる表面抗原である**CD86,CD54**の発現変化*に着目

*:S. Aiba, et al., Eur. J. Immunol., 27, 3031-3038, 1997.

皮膚感作性試験h-CLAT法の概要

● プロトコル*



THP-1



被験物質暴露

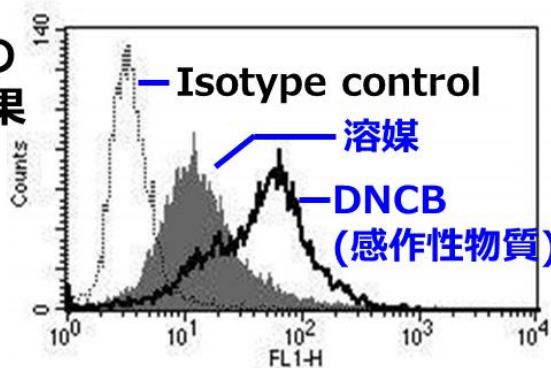
蛍光標識抗体染色
(**CD86 & CD54**)



フローサイトメーター
による解析

● 結果と予測モデル

CD86の
解析結果



陽性判定基準値:

溶媒対照群に対する相対蛍光強度RFIを算出し

CD86 RFI \geq 150% or CD54 RFI \geq 200%

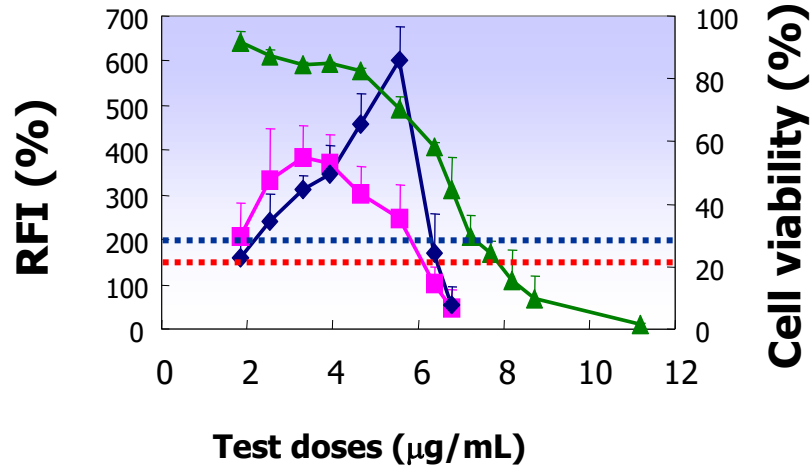
“h-CLAT”と命名

human Cell Line Activation Test, ヒト由来の培養細胞を用いた活性化試験

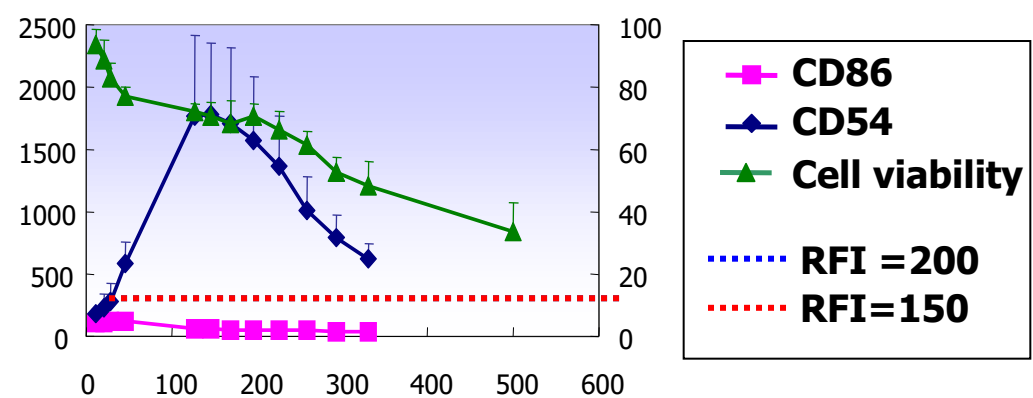


SHISEIDO

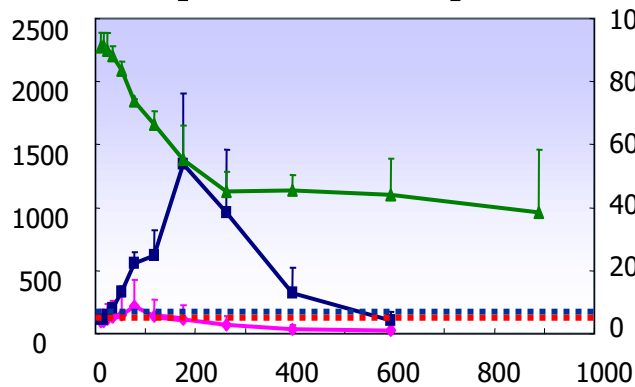
DNCB (extreme)



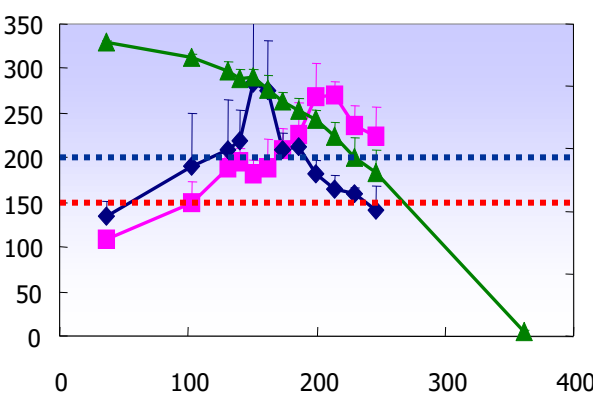
Propyl gallate (strong)



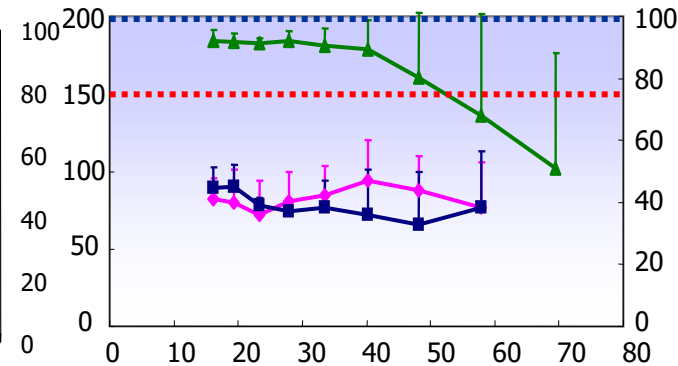
Nickel sulfate (moderate)



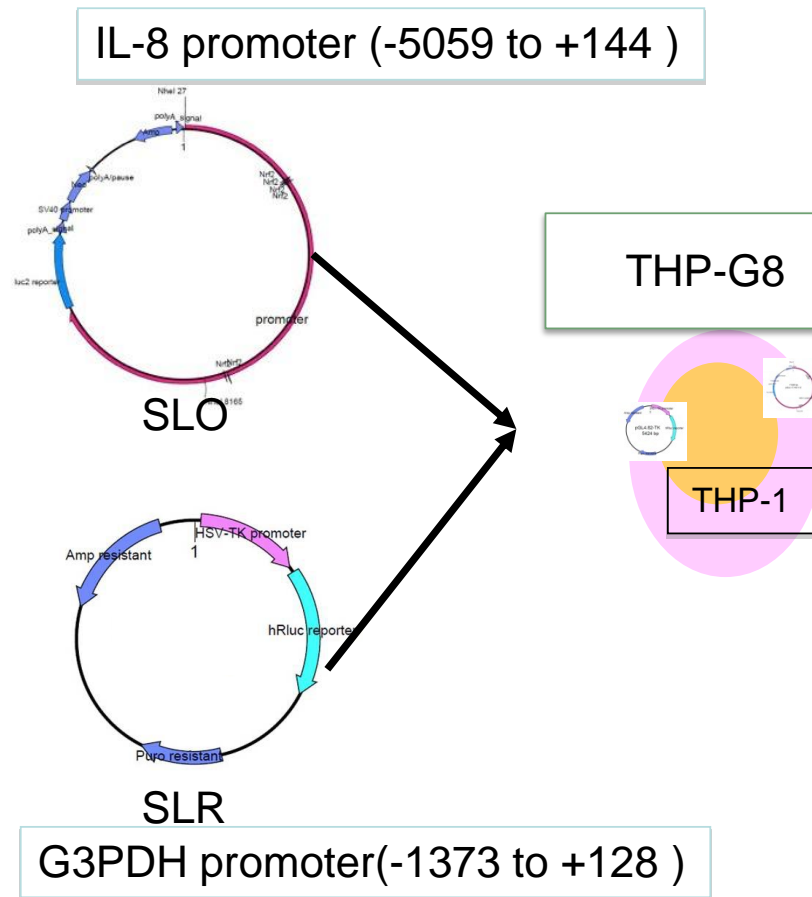
Eugenol (weak)



SLS (non-allergen)



IL-8 reporter cell derived from THP-1 (THP-G8)



1. Cell line

A stable IL-8 reporter cell line, THP-G8, was established by transfection of the following 2 plasmid vectors into THP-1.

- 1) SLO luciferase genes is regulated by the IL-8 promoter.
- 2) SLR luciferase genes is regulated by glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) .

2. Luciferase activity

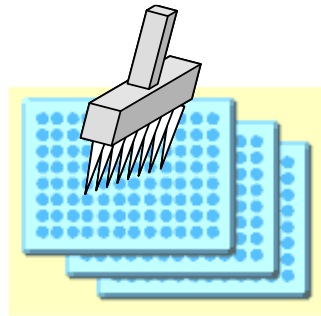
Luciferase activity was determined by a microplate type luminometer with multi-color detection system, using Tripluc® luciferase assay reagent. The activities of SLO luciferase activity and SLR-luciferase can be measured simultaneously and quantitatively with optical filters (Nakajima *et al.*, 2005; Noguchi *et al.*, 2008).

Takahashi T *et al.* Toxicol Sci, 2011
Kimura Y *et al.* Toxicol in Vitor, 2015
Kimura Y *et al.* J Toxicol Sci, 2018

The IL-8 Luc assay as an *in vitro* sensitization test

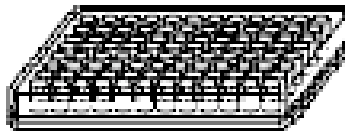
LLNA THP-G8	Allergen	Non-allergen	Total
Allergen	70	3	73
Non-allergen	19	26	45
Total	89	29	118

IL-8 Luc assay	
False negative	21
False positive	10
Sensitivity	79
Specificity	90
Accuracy	81
Incubation time	16 hr



96well plate

30 min to 1 h or more
Manual and dependent on
the number of chemicals



Incubation time

16 h (IL-8 Luc assay)
24 h (h-CLAT)
48 h (Keratinosens)



Measure

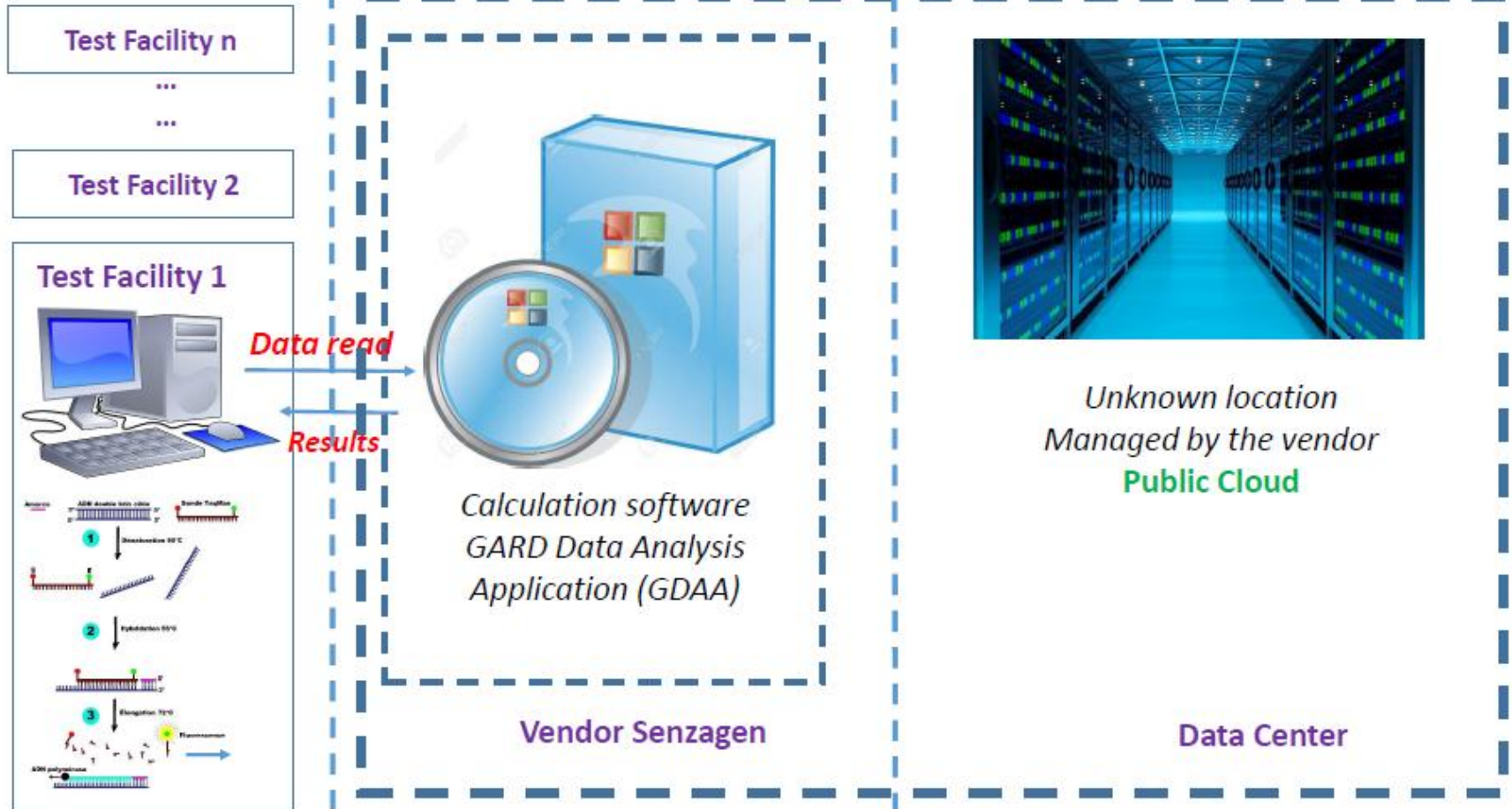
Automated and 20 min (IL-8 Luc assay)
Several h ? (h-CLAT)
Automated and 20 min ? (Keratinosens)

Neither preculture nor viability testing is required → At most 4 days for one chemical

Kimura Y et al. Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. In submission.

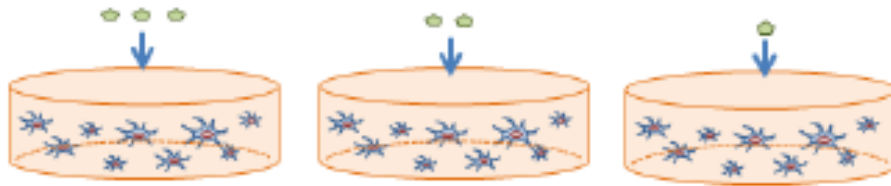
TG442EへのGARD™Skinの追加

GARD (SaaS)



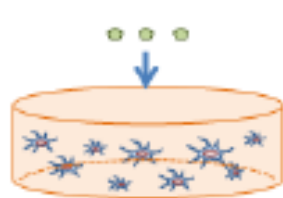
GARD Input Finder - Determination of the test substance concentration, where the cells react and $90\% \pm 5\%$ survive (RV)

Test substance

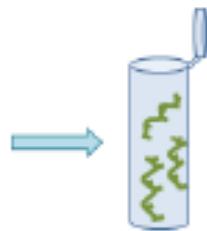


Grown SenzaCells are incubated with different concentration of test substance

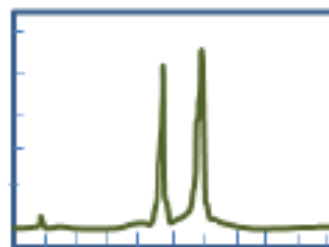
GARD Main Stimulation: Three independent experiments on the different batches of cells



Incubation with the test substance of determined concentration



RNA isolation



RNA quality check with Bioanalyzer



RNA hybridisation with 196 genes selected for sensitisation.

After hybridisation RNA-samples are prepared on a cartridge by an nCounter Prepstation

Data analysis with nCounter Digital Analyser

SENZA
GEN

RNA quality check and data analysis in collaboration with SenzaGen AB

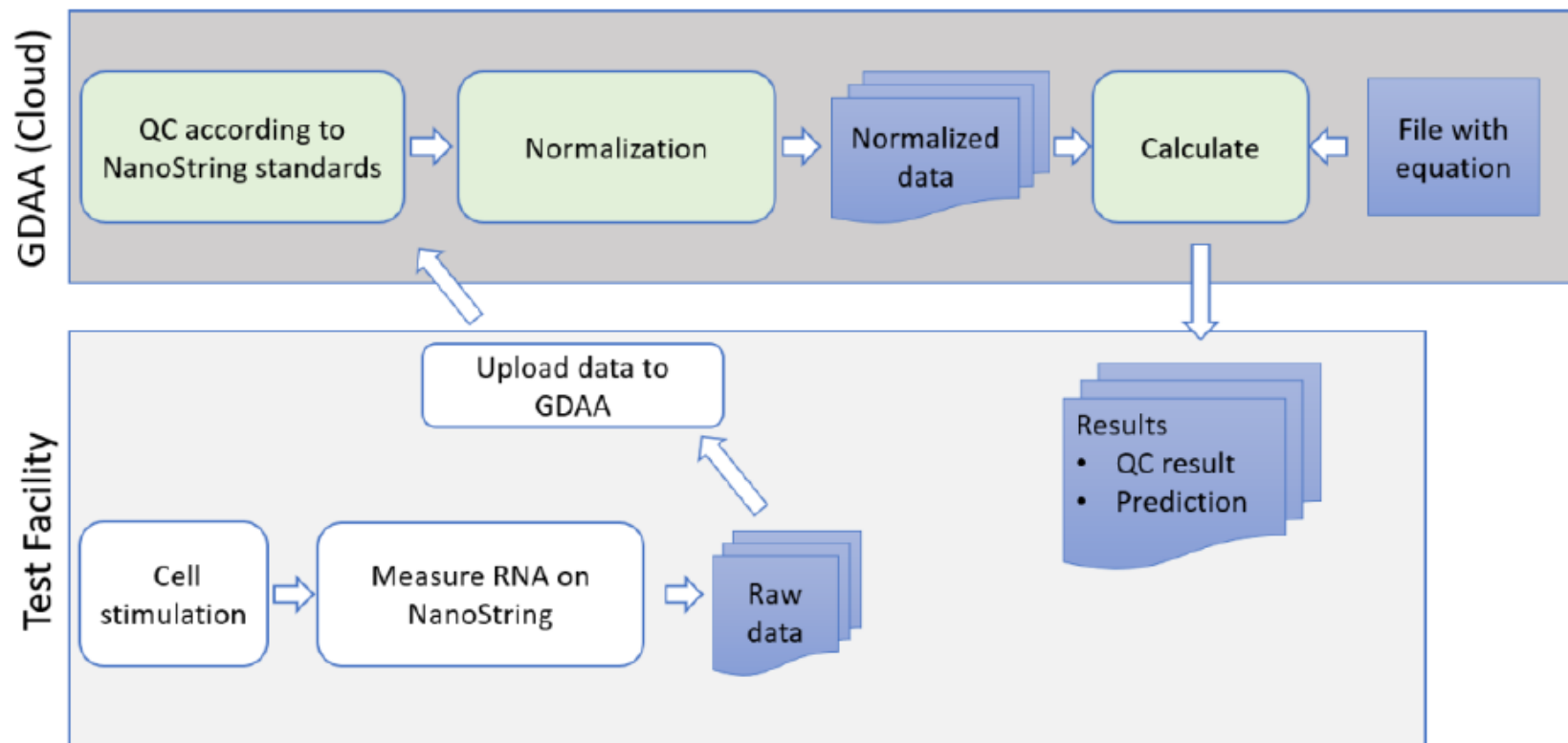


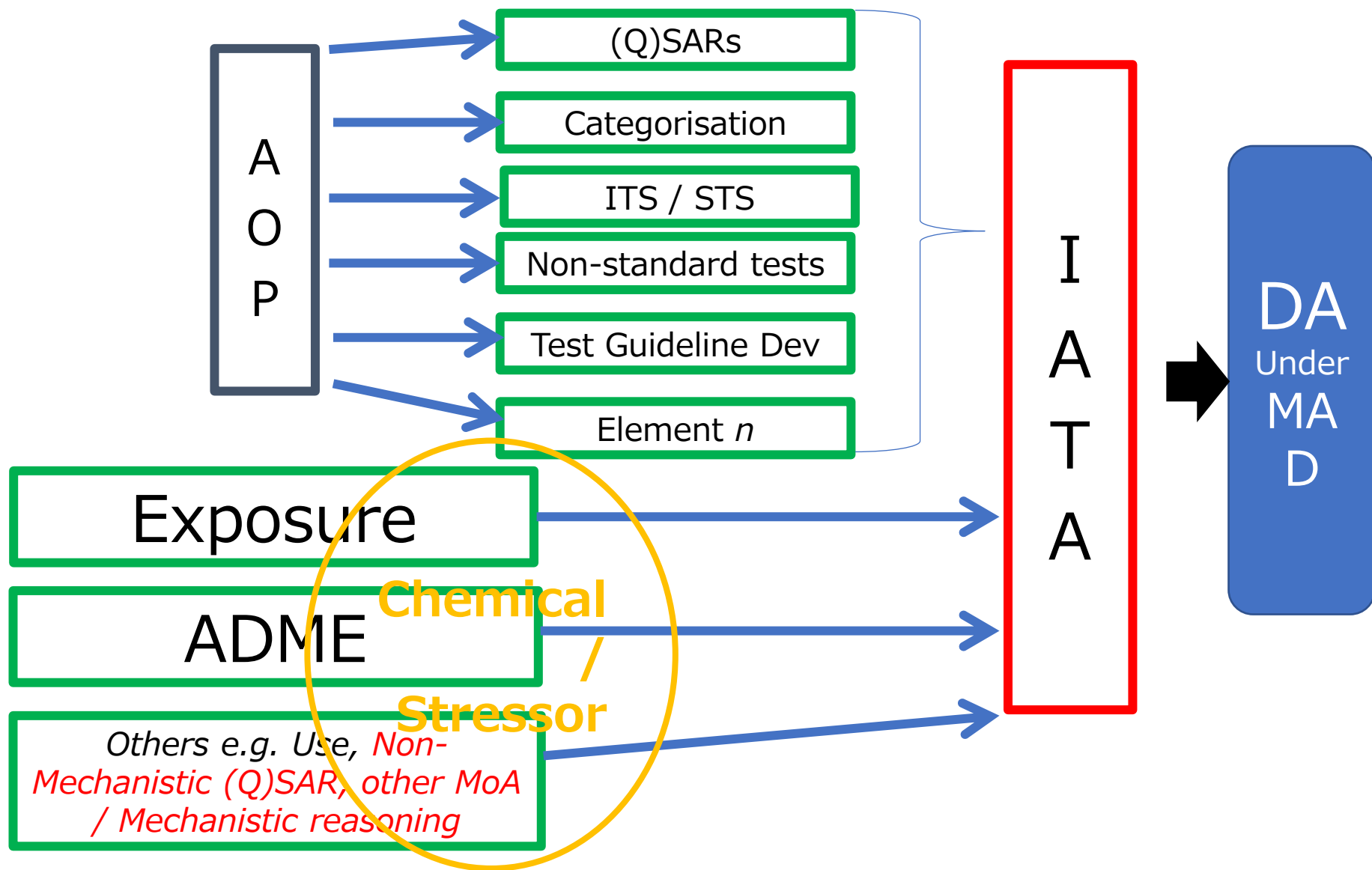
Figure 2. Schematically illustrates the workflow of the Test Facility and its interaction with the cloud-based GDA software. In short, the Test Facility performs the GARD® assay and obtains NanoString RCC files which are uploaded to GDA. After Quality Control and normalization, the data is fed into the prediction algorithm. The output predictions are provided to the Test Facility both onscreen and as a downloadable Prediction Report. All activities in the lower box (Test Facility) are under the responsibility of the Test Facility.

	DPRA	Keratinosens™	h-CLAT
N	157	201	142
Accuracy (%)	80	77	85
Sensitivity (%)	80	78	93
Specificity (%)	77	76	66

- 単独での新規物質を評価できない。
- 偽評価物質が多い。

ADRAの予測結果は、上表から算出した。DPRA、Keratinosens™およびh-CLATの予測精度は、それぞれOECD guidelines for the testing chemicals, No. 442C (2015), No. 442D (2018), and No. 442D (2018), から引用した。

OECDガイドライン497

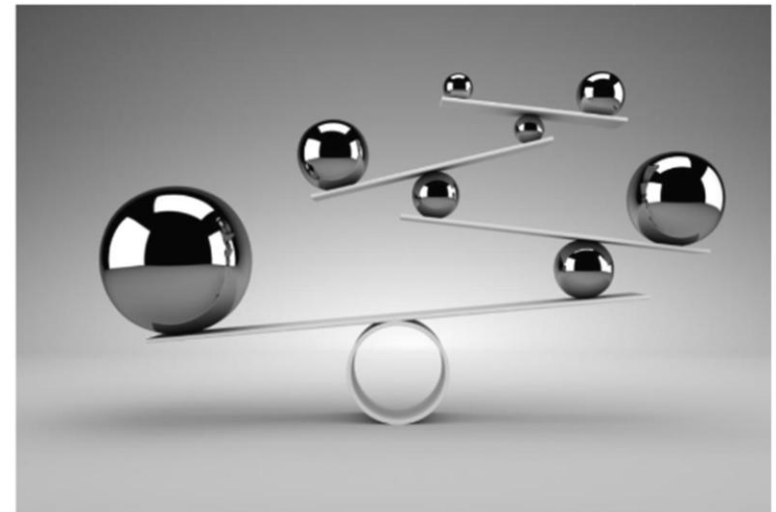
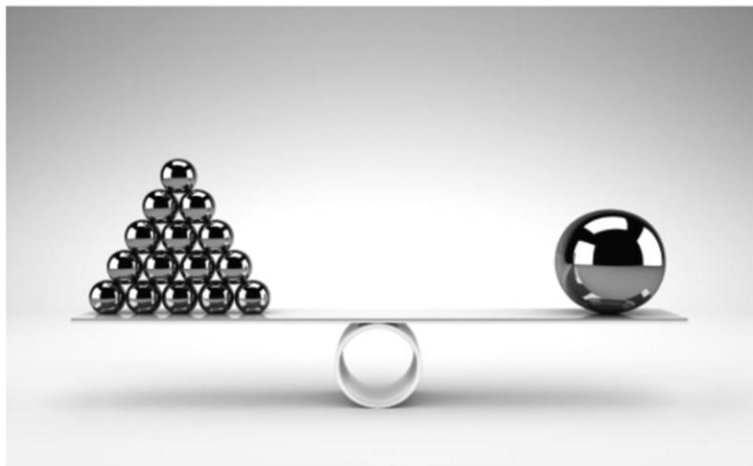


全身毒性を非動物で評価するための
Defined Approach(DA)開発へ

Concept and validation of Defined Approaches and IATA

Defined Approach

- Fixed information sources
- Fixed Data Interpretation Procedure
- **Can be validated and falls under MAD**



Integrated Approach to Testing and Assessment

- Flexible approach
- Weight of evidence/expert judgement
- Need for a confidence building framework

João Barroso (Joint Research Centre, EURL ECVAM)



Section 4
Health effects

Guideline No. 497
Guideline on Defined Approaches for Skin
Sensitisation

14 June 2021



Guideline 497とは？

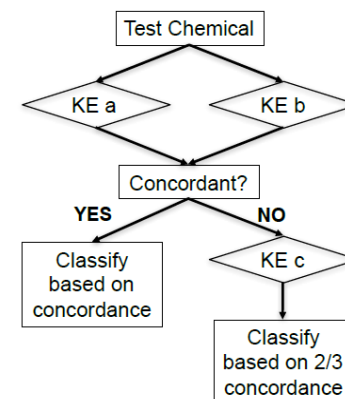
2021年6月14日、OECD（経済協力開発機構）は、皮膚感作のデフィンド アプローチ（DA）によるガイドライン（OECD GL No. 497）を発表した。これは新しいタイプのOECDガイドラインであり、以下に示す画期的な点が複数含まれている。

- 1 初めて*in vitro*試験法の結果を組み合わせ評価する手法が公定化された。
- 2 初めて*in silico*の利用が組み合わせ評価に利用された。
- 3 初めてヒトの毒性が評価された。

OECD: Guideline Defined Approaches for Skin Sensitisation

1. 2 out of 3 Defined Approach for Hazard Identification

2. ITS Defined Approaches for Skin Sensitisation Potency following the Globally Harmonised System



ITSv1

Score	h-CLAT MIT	DPRA depletion	DEREK
3	≤10 µg/mL	≥42.47%	-
2	>10, ≤150 µg/mL	≥22.62, <42.47%	-
1	>150, ≤5000 µg/mL	≥6.376, <22.62%	Alert
0	not calculated	<6.376%	No alert

Potency: Total Battery Score

Strong (1A): 6-7

Weak (1B): 2-5

Not classified: 0-1

ITSv2

Score	h-CLAT MIT	DPRA depletion	OECD 7 B
3	≤10 µg/mL	≥42.47%	-
2	>10, ≤150 µg/mL	≥22.62, <42.47%	-
1	>150, ≤5000 µg/mL	≥6.376, <22.62%	Sens
0	not calculated	<6.376%	Non

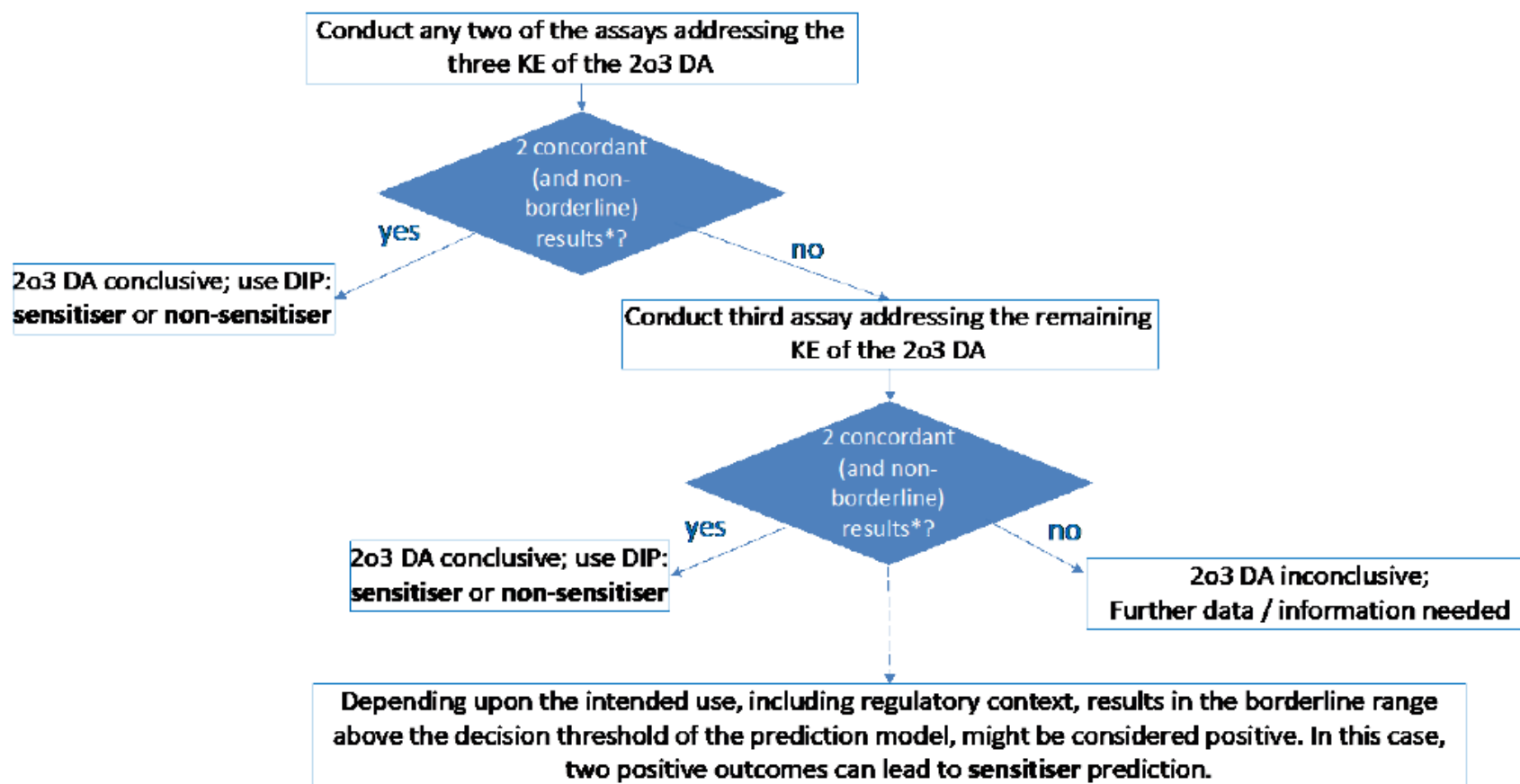
Potency: Total Battery Score

Strong (1A): 6-7

Weak (1B): 2-5

Not classified: 0-1

Figure 2.1. Decision tree to be used for the 2o3 DA, taking into account borderline results



有害性の同定（感作性の有無）

適用範囲（AD）の設定

- From the DA individual information sources

Limiting condition	Applicability						Kao ITS?
	DPRA?	KeratinoSens TM ?	h-CLAT?	Derek Nexus	OECD Toolbox	BASF 2/3?	
Solubility threshold	Yes, below: no acceptance of stand-alone (-)ve	Yes, below: no acceptance of stand-alone (-)ve	No				
LogKow > 3.5	Yes	Yes	No acceptance for (-)ve	Yes	Yes	Only if h-CLAT not used for (-)ve?	No
Lysine-reactive chemicals (exclusive)	Yes, not an issue	No	Yes, not an issue	Yes	Yes	Only if KeratinoSens TM not used?	Yes
Pre- and pro-haptens	No for (-)ve	No for (-)ve	No for (-)ve			No for (-)ve	No for (-)ve
Strong fluorescent	--	--	No	--	--	Only if h-CLAT no used	Np

それぞれの方法のADが採用される

不確定因子の解消に向けて

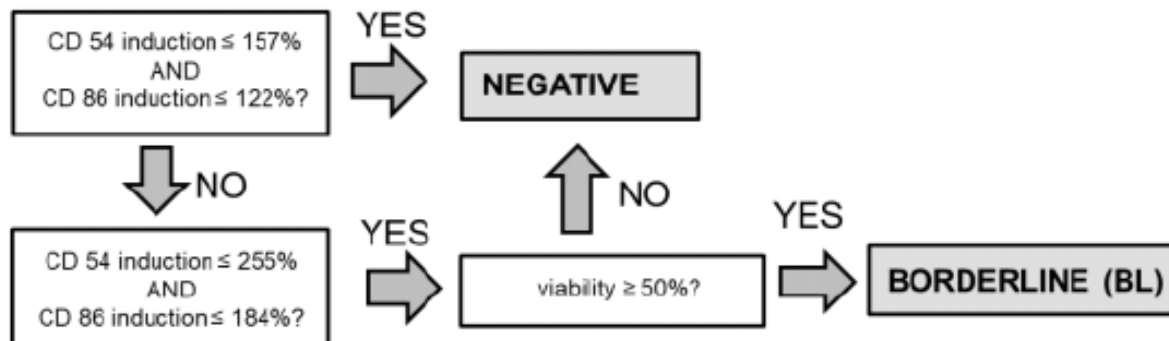
- *In vivo* (Human and LLNA database) を濃度依存性等で見直し168物質のリスト
- 203の場合、*in vitro* testにおけるBoaderlineの設定

Table 3.1. Summary of the experimentally derived borderline ranges for the 203 DA

	Endpoint	Cut-off	TG borderline range	Validation study mean
DPRA (OECD TG 442C)	Mean peptide depletion [%]	6.38	3-10 ^a	4.95 - 8.32
	Cysteine-only depletion [%]	13.89	9-17 ^a	10.56 - 18.47
KeratinoSens (OECD TG 442D)	Luciferase induction (fold-change)	1.5	n/a	1.35 - 1.67
h-CLAT (OECD TG 442E)	Relative fluorescence intensity CD54	200	n/a	157 - 255
	Relative fluorescence intensity CD86	150	n/a	122 - 184

例えば、h-CLATのPrediction model

Procedure for one full run:



203の場合、h-CLAT TGのprediction modelは参考法となる



Perform at least two independent runs.

- If two are POSITIVE, final outcome is POSITIVE
- If two are NEGATIVE, final outcome is NEGATIVE
- If two are BL, final outcome is BL

In case first two outcomes are not congruent (mixed results from BL, POS and/or NEG) a third repetition is made and final outcome is based on the two congruent outcomes.

[TWO BL] or [one BL, one NEG and one POS] ⇒ Final outcome BL

Annex 1, Figure 1.3. Flow-chart of the h-CLAT prediction model taking into account borderline ranges and multiple runs to conclude on borderline results within the 203 DA. The original threshold for a positive classification is 150% induction of CD86 with a statistically derived borderline range around this threshold of 122 – 184% and 200% induction of CD54 with a statistically derived borderline range around this threshold of 157 – 255%.

Table 2.1. Hazard identification performance of the “2o3” DA in comparison to LLNA reference data

	LLNA	
2o3 DA	Non	Sens
Non	22	19
Sens	4	89
Inconclusive	7	27

DA Performance vs. LLNA Data (N=134)	2o3
Accuracy (%)	83%
Sensitivity (%)	82%
Specificity (%)	85%
Balanced Accuracy (%)	84%

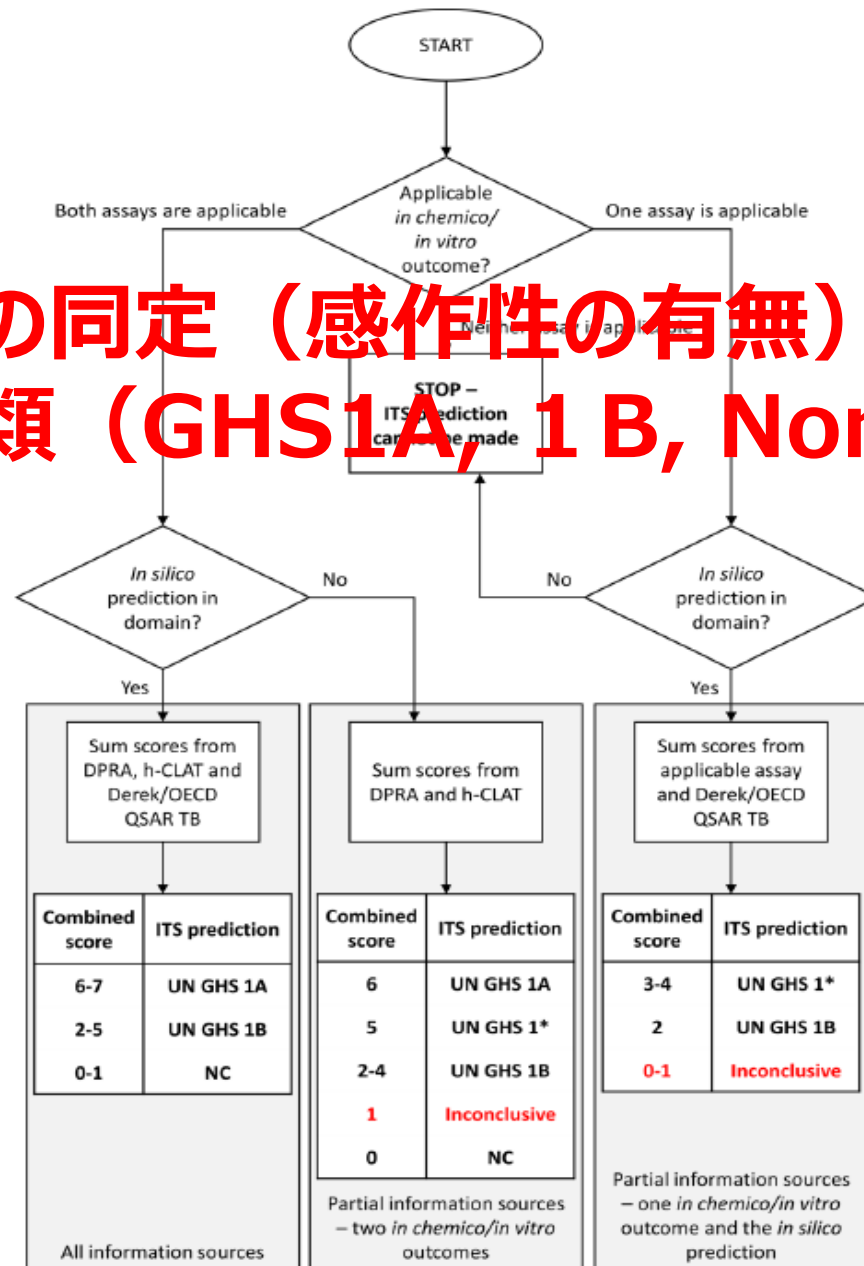
Table 2.2. Hazard identification performance of the “2o3” DA in comparison to human reference data

	Human	
2o3 DA	Non	Sens
Non	7	5
Sens	1	42
Inconclusive	3	7

DA Performance vs. Human Data (N=55)	2o3
Accuracy (%)	89%
Sensitivity (%)	89%
Specificity (%)	88%
Balanced Accuracy (%)	88%

Figure 3.1. Decision tree for assigning confidence to the ITS DA predictions

有害性の同定（感作性の有無）および 強度分類（GHS 1A, 1B, None）



*Conclusive for hazard, inconclusive for potency

ITS Defined Approaches for Skin Sensitisation Potency following the Globally Harmonised System

Table 3.1. Schematic of the ITS defined approach. The DA is a simple score-based system depending on assays from OECD TG 442E and 442C, and an *in silico* structure-based prediction, as shown.^a

Score ^a	h-CLAT ^a MIT µg/mL ^a	DPRA ^a mean Cysteine and Lysine% depletion ^a	DPRA ^a Cysteine % depletion ^a	<i>In silico</i> ↓ (ITSv1: DEREK; ↓ ITSv2: OECD TB) ^a
3 ^a	≤10 ^a	≥42.47 ^a	≥98.24 ^a	
2 ^a	>10, ≤150 ^a	≥22.62, <42.47 ^a	≥23.09, <98.24 ^a	
1 ^a	>150, ≤5000 ^a	≥6.38, <22.62 ^a	≥13.89, <23.09 ^a	Positive ^a
0 ^a	not calculated ^a	<6.38 ^a	<13.89 ^a	Negative ^a
	Potency ^a	Total Battery Score ^a		
	UN GHS 1A ^a	6-7 ^a		
	UN GHS 1B ^a	2-5 ^a		
	Not classified ^a	0-1 ^a		

OECD QSAR Tool Box の適用範囲

Table A2.1. Applicability domain layers for the QSAR Toolbox automated workflow “Skin sensitisation for defined approaches” predictions.

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

Physico-chemical parameter	Calculated Parameter range
Log Kow	-9.66 ÷ 18.6
Molecular weight	16 Da ÷ 2290 Da
Vapour pressure*	0 Pa ÷ 3.45×10^7 Pa
Water solubility	2.48×10^{-13} mg/L ÷ 1.00×10^6 mg/L

*EPTWIN Vapor Pressure (Antoine method) is used for calculation

- The integrated testing strategy (ITSv1) for UN GHS potency categorisation based on *in chemico* (KE1) and *in vitro* (KE3) data, and *in silico* (Derek Nexus) predictions (14, 15), with a DIP developed with expert group (EG DASS) input. See Part II Potency Categorisation.

	LLNA		
ITSv1 DA	NC	1B	1A
NC	21	11	0
1B	9	55	10
1A	0	12	28
Inconclusive	3	7	0

71% correct classification overall

- A modification of the integrated testing strategy (ITSv2) for UN GHS potency categorisation based on *in chemico* (KE1) and *in vitro* (KE3) data, and *in silico* (OECD QSAR Toolbox) predictions, with a DIP developed with expert group (EG DASS) input. See Part II Potency Categorisation.

	LLNA		
ITSv2 DA	NC	1B	1A
NC	20	9	0
1B	10	54	10
1A	0	12	26
Inconclusive	3	10	2

71% correct classification overall

GL497に準じた予測性

DA/Method	Hazard Performance vs. LLNA	Hazard Performance vs. Human	Potency Performance vs. LLNA (Accuracy)	Potency Performance vs. Human (Accuracy)
2o3 DA	84% BA, 82% Sens, 85% Spec	88% BA, 89% Sens, 88% Spec	-	-
ITSv1 DA	81% BA, 92% Sens, 70% Spec	69% BA, 93% Sens, 44% Spec	70% NC, 71% 1B, 74% 1A	44% NC, 77% 1B, 65% 1A
ITSv2 DA	80% BA, 93% Sens, 67% Spec	69% BA, 94% Sens, 44% Spec	67% NC, 72% 1B, 72% 1A	44% NC, 80% 1B, 67% 1A
LLNA (provided for comparison)	-	58% BA, 94% Sens, 22% Spec	-	25% NC, 74% 1B, 56% 1A

Part III–SECTION 4 - Defined Approaches for Derivation of a Quantitative Point of Departure

Figure 4.1 Workflow for the SARA-ICE DA

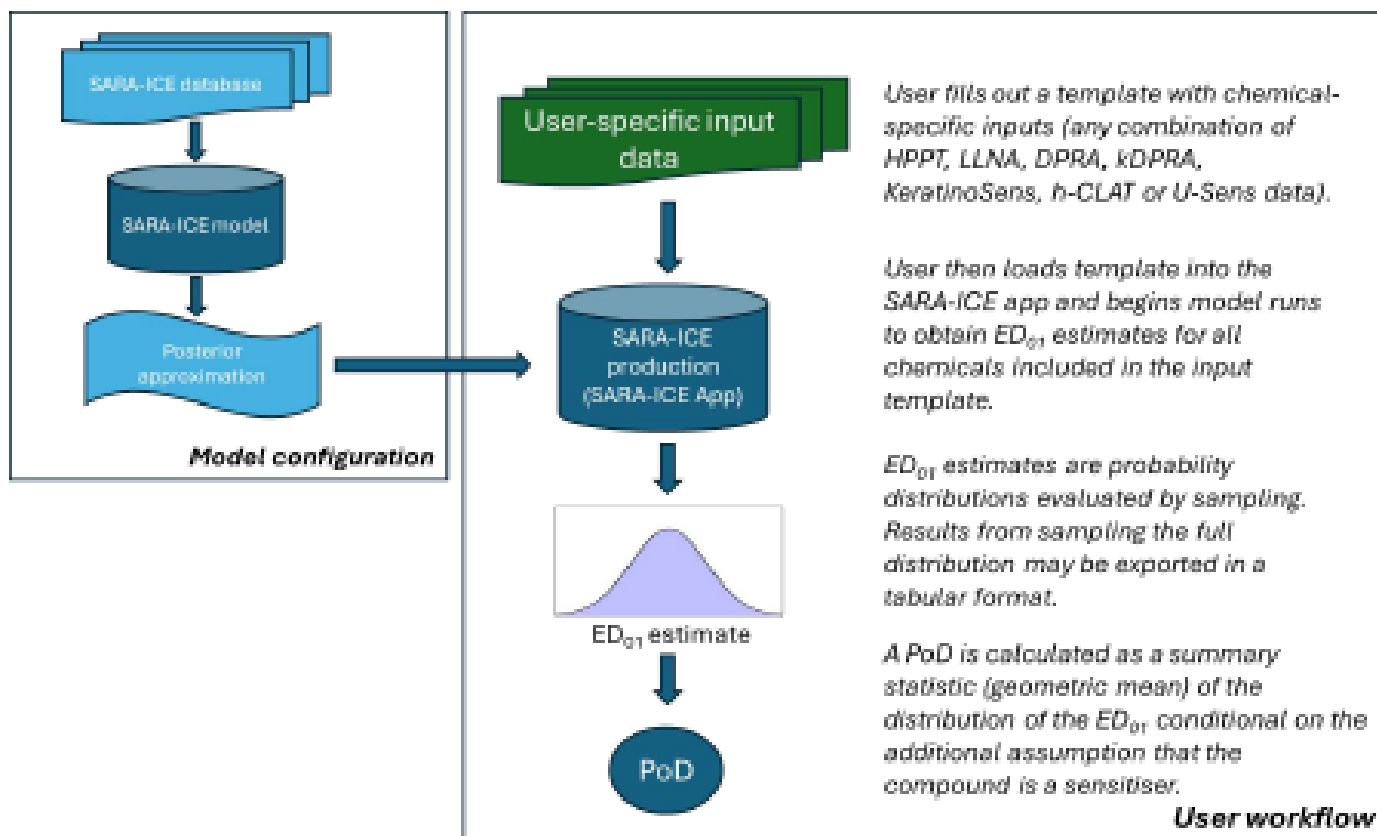
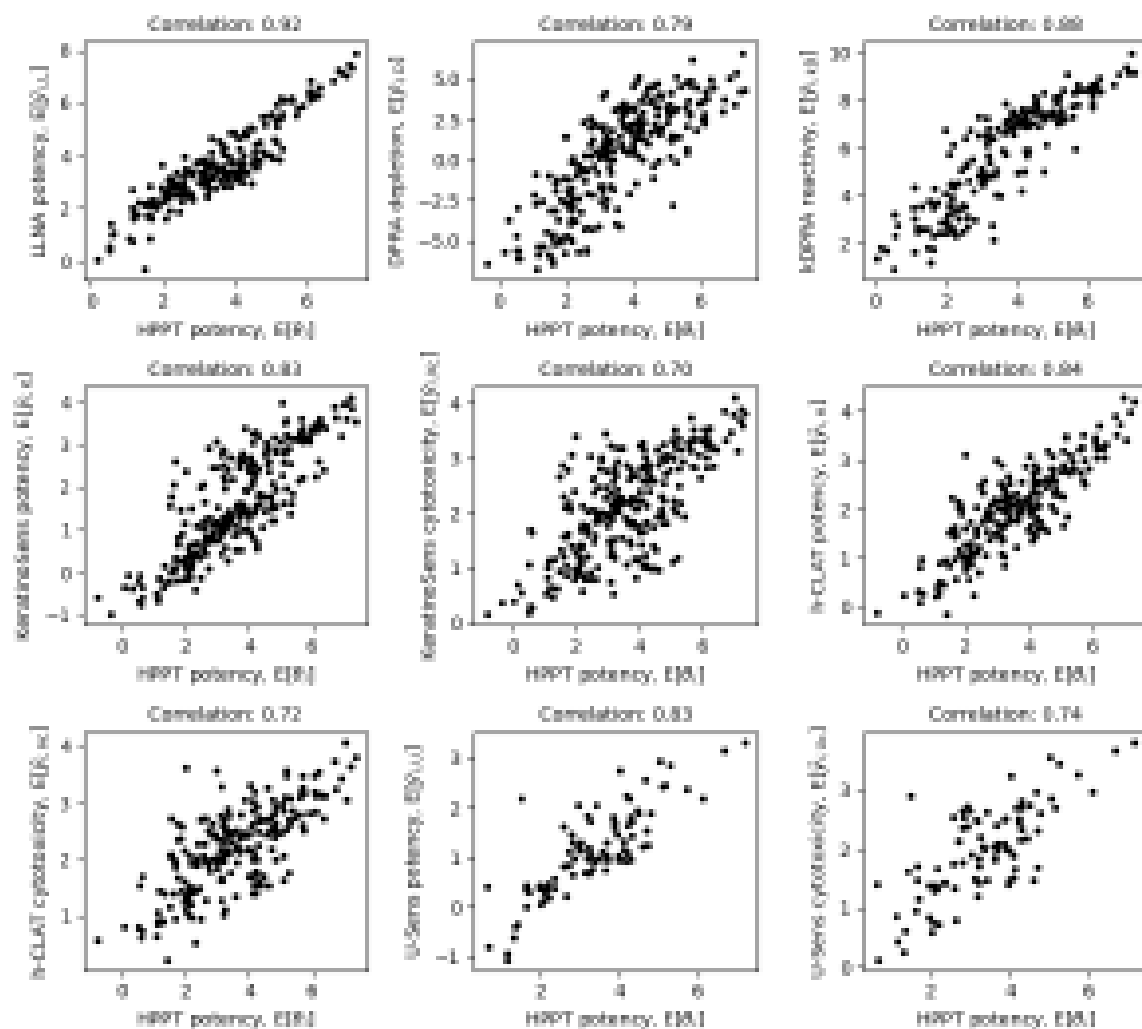


Table 4.1. Summary of Acceptable Test Methods for SARA-ICE

Test Methods	Test Guideline	Key Event	Data Input
DPRA	TG 442C	1	Percent depletion (Cys and Lys)
kDPRA	TG 442C	1	log kmax (units $M^{-1} s^{-1}$)
KeratinoSens	TG 442D	2	EC _{1.5} and IC ₅₀ (μM)
h-CLAT	TG 442E	3	EC200 (CD54) EC150 (CD85) CV75 ($\mu g mL^{-1}$)
U-SENS	TG 442 E	3	EC150 and CV70 ($\mu g mL^{-1}$)
LLNA	TG 429, TG 442A, TG 442B	4	EC3 (percent)
HPPT	N/A	AO*	Dermal dose ($\mu g cm^{-2}$, N test subjects, N subjects sensitised)

*Adverse Outcome

Figure 4.2. Correlations between the SARA-ICE representation of sensitiser potency (abscissa) versus SARA-ICE representation of the average assay result (ordinate), after transformation. Each point corresponds to a distinct compound within the SARA-ICE database provided that the compound has both HPPT and assay-specific data available.



OECDで採用されているDefined Approach (GL497, 2025)

分類	TG, GL名	小分類	試験法
皮膚感作性	GL497	2o3	TG442C:ADRA, DPRA TG442D:EpiSensA, KeratinoSens TM , LuSens TG442E:GARD®skin, h-CLAT, IL-8 Luc assay, U-SENS TM
		ITS	TG442C:ADRA, DPRA TG442E:GARD®skin, h-CLAT, U-SENS TM In silico: OECD QSAR Toolbox, Derek Nexus

OECDで採用の予定があるDefined Approach

分類	TG, GL名	小分類	試験法
皮膚感作性	GL497	2o3	TG442C:ADRA, DPRA TG442D:EpiSensA, KeratinoSens TM , LuSens TG442E:GARD®skin, h-CLAT, IL-8 Luc assay, U-SENS TM
		ITS	TG442C:ADRA, DPRA TG442E:GARD®skin, h-CLAT, U-SENS TM In silico: OECD QSAR Toolbox, Derek Nexus, iSafeRat, Leadscope Model Applier, StopTox

小括

- 皮膚感作性試験は、DASSの開発により代替法のみで皮膚感作性の有無が可能な新たな時代に入った。
- *in silico*も組み合わせれば、代替法のみでUN GHSの分類が可能となった。
- さらに、SARA-ICEのようにPoDを測定できる方法もGL497には加わっている。
- GL497に採用される試験法は増え続けており、まだ全容は固まっていない。

国内規制の動向

化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンス検討会

目的：「代替法利用の促進を図るためガイダンスを作成し、申請者に利用を促すこと」

平成23年2月(2011年)「医薬部外品等の安全性試験法に関するガイダンス検討会」
(平成23年度レギュラトリーサイエンス総合研究事業：研究代表者 小島肇)

- 検討会参画者：
 - ・ 厚生労働省生活衛生局審査管理課
 - ・ 医薬品医療機器総合機構
 - ・ 国立医薬品食品衛生研究所
 - ・ 皮膚科医
 - ・ 日本化粧品工業連合会
- ガイダンス提案対象試験法：JaCVAMにおいて評価が終了した試験法
- ガイダンス化手順：
 - ガイダンス検討会におけるガイダンス案の作成
 - ⇒JaCVAMのHPにおけるパブリックコメントの募集、対応
 - ⇒厚労省HPにてガイダンス公開
- ガイダンス発出：厚生労働省生活衛生局医薬品審査管理課

[TOP](#)
[JaCVAMとは](#)
[JaCVAMの活動](#)
[進行中の試験一覧と資料](#)
[試験法の公募
パブリックコメント募集](#)
[国際協調](#)
[JaCVAM関連委員会](#)


JaCVAMは、化学物質の安全性評価における動物実験の **3Rs** の促進と国際協調を重視した新規動物実験代替法の公定化を進めます。



医薬部外品のための代替法の活用に関するガイダンス

評価項目	試験名	発出時期	ガイダンス名
光毒性	3T3-NRU-PT	2012年4月26日	光毒性試験代替法としてのin vitro3T3-NRU光毒性試験を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンス
皮膚感作性	LLNA法	2012年4月26日	皮膚感作性試験代替法としてのLLNAを化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンス
	LLNA:DA法	2013年5月30日	皮膚感作性試験代替法としてのLLNA:DAを化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンス
	LLNA:BrdU-ELISA法	2013年5月30日	皮膚感作性試験代替法としてのLLNA:BrdU-ELISAを化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンス
	<i>in vitro</i> 組合せ評価法	2018年1月11日	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み合わせた評価体系に関するガイダンス
	<i>in vitro</i> 組合せ評価法	2025年3月28日	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
眼刺激性	BCOP法	2014年2月4日	眼刺激性試験代替法としての牛摘出角膜の混濁および透過性試験法（BCOP）を化粧品・医薬部外品の安全性評価に資するためのガイダンス
	動物実験	2015年2月27日	眼刺激性試験を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するための留意事項
	ICE法	2015年11月16日	眼刺激性試験代替法としてのニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験法（ICE）を化粧品・医薬部外品の安全性評価に資するためのガイダンス
	STE法	2018年12月18日	医薬部外品・化粧品の安全性評価における眼刺激性試験代替法としてのウサギ角膜由来株化細胞を用いた短時間暴露法(STE法)に関するガイダンス
	RhCE法	2019年6月24日	医薬部外品・化粧品の安全性評価における眼刺激性試験代替法としての再構築ヒト角膜様上皮モデル法(RhCE法)に関するガイダンス
経皮吸収	<i>In vitro</i> 経皮吸収試験	2016年11月15日	<i>In vitro</i> 皮膚透過試験（ <i>In vitro</i> 経皮吸収試験）を化粧品・医薬部外品の安全性評価に資するためのガイダンス
急性毒性	<i>In vitro</i> 細胞毒性試験	2021年4月22日	医薬部外品・化粧品の単回投与毒性評価のための複数の安全性データを組み合わせた評価体系に関するガイダンス
皮膚刺激性	RhE法	2021年4月22日	医薬部外品・化粧品の安全性評価における皮膚刺激性を評価するための評価体系に関するガイダンス
光安全性	試験法組み合わせ	2022年10月28日	医薬部外品・化粧品の光安全性試験評価体系に関するガイダンス

農薬取締法におけるハザード評価（H30改定）

判定方法	区分	判定基準
A	区分 1 (皮膚感作性物質)	・OECD テストガイドライン 442C、442D、442E に準拠した試験データの 2 試験以上で陽性
	区分外	・OECD テストガイドライン 442C、442D、442E に準拠した試験データの 2 試験以上で陰性
B	区分 1 (皮膚感作性物質)	以下のいずれかに該当する場合： ・OECD テストガイドライン 442E に準拠した試験データで陽性 又は ・OECD テストガイドライン 442E に準拠した試験データが陰性の場合、OECD テストガイドライン 442C に準拠した試験データを実施し、その結果が陽性
	区分外	・OECD テストガイドライン 442E 及び 442C に準拠した試験データで両方とも陰性

a：有効成分のデータ要求では、*in vitro* 試験法で試験を実施する場合は

OECD の IATA ガイダンス文書（OECDGD No. 256）*の Annex I の Case study I 又は X に示された手順で試験を実施することとしている。判定方法 A 及び B はこの手順に準じている。

* OECD Series on Testing and Assessment No. 256 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 (ENV/JM/MONO(2016)29)

なお、現在、OECD テストガイドラインとして採択されている *in vitro* 試験法の中には、被験物質の適用範囲が限られている場合（例えば TG442D の場合は LogP が 7 を超える疎水性の極めて高い物質には適用が困難）があり、適用範囲外の試験法で実施した結果は、分類に用いることはできない。このため、試験の実施前に、参照する OECD テストガイドラインの適用範囲を十分確認すること。

図表 3.5.36 OECD で承認された皮膚感作性に関する試験法

種 類	試験方法			備考
	OECD TG No	試験名(原文)	試験名(日本語)	
<i>in vivo</i>	TG 406	Skin Sensitisation	皮膚感作性試験	以下の2つの方法がある; ✓アジュバント(免疫増強剤) ¹⁾ を用いるモルモットのマキシマイゼーション法(Guinea Pig Maximisation Test; GPMT 法とも呼ばれる) ²⁾ ✓アジュバントを用いないモルモットのビューラー法(Buehler Test)
	TG 429	Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay	皮膚感作:局所リンパ節試験	LLNA 法とも呼ばれる。
	TG 442A	Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA	皮膚感作性:局所リンパ節試験: DA	LLNA:DA 法とも呼ばれる。
	TG 442B	Local lymph node assay: BRDU-ELISA or -FCM	皮膚感作性:局所リンパ節試験: BrdU-ELISA	LLNA:Brdu 法とも呼ばれる。
動物実験代替試験	TG 442C	<i>In Chemico</i> Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)	<i>in Chemico</i> 皮膚感作性:ペプチド結合性試験	感作成立の初期反応である化学物質とタンパク質の結合に着目した皮膚感作性試験。
	TG 442D	<i>In vitro</i> skin sensitisation assays addressing the AOP key event on keratinocyte activation	角化細胞活性化の AOP key event に着目した <i>in vitro</i> 皮膚感作性試験	•Key event ベースのテストガイドライン。詳細は(参考)OECD TG442Dと442Eに関する補足説明を参照。 •以下の2つの方法がある; ✓The ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSens™ test method ✓The ARE-Nrf2 luciferase LuSens test method
	TG 442E	<i>In vitro</i> skin sensitisation assays addressing the key event on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitisation	樹枝状細胞活性化の AOP key event に着目した <i>in vitro</i> 皮膚感作性試験	•Key event ベースのテストガイドライン。詳細は(参考)OECD TG442Dと442Eに関する補足説明を参照。 •以下の3つの方法がある; ✓Human Cell Line Activation test (h-CLAT) ✓U937 cell line activation Test (U-SENS™) ✓Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay)

総括

- ・化学物質は多種多様であり、代替法の適用限界を考えると、動物実験による試験法を無くすことは難しいと考える。
- ・適用限界やボーダーラインの把握など制限も多く、専門家の育成が急務であると考ええる。

ただし、OECDにおいて、動物実験代替法としては3T3NRU光毒性試験の成立した2004年から18年、安全性評価における“動物を用いない試験”の利用が一つの岐路を迎えたと考えている。

ご静聴ありがとうございました

資料提供頂いた皆さんにこの場をおかりして、感謝申し上げます

