

粧工連における代替法を用いた皮膚感作性評価への取り組み(第1報) — *in vitro* 試験/*in silico* system を組み合わせた評価体系の構築 —

1, 11 竹之内 修、2, 11 福井 志穂、2, 11 岡本 賢二、3, 11 黒谷 達、3, 11 今井 教安、
4, 11 藤代 美有紀、4, 11 京谷 大毅、5, 11 加藤 義直、6, 11 笠原 利彦、
6, 11 藤田 正晴、7, 11 豊田 明美、8, 11 関谷 大輔、8, 11 渡辺 真一、9, 11 瀬戸 洋一、
10, 11 廣田 衛彦、10, 11 足利 太可雄、1, 11 宮澤 正明

1 花王(株)、2 (株)カネボウ化粧品、3 (株)コーセー、4 (株)コスモステクニカルセンター、
5 日本メナード化粧品(株)、6 富士フイルム(株)、7 ポーラ化成工業(株)、8 ライオン(株)、
9 P & G ジャパン(株)、10 (株)資生堂、
11 日本化粧品工業連合会 感作性試験代替法ワーキンググループ

[背景、目的]

現在、皮膚感作性のキーとなる現象に基づいた有用な動物試験代替法が開発されている。花王においても、樹状細胞の活性化に着目した試験法である *in vitro* 皮膚感作性試験 human Cell Line Activation Test (h-CLAT)を開発している。しかし、100品の化学物質を h-CLAT で評価した結果、動物試験(LLNA)との一致率は84%¹⁾であったことから、h-CLAT 単独での LLNA の完全代替は困難であり、複数の代替法を組み合わせる評価を行っていくことが必要である。そこで、日本化粧品工業連合会では、世界に通じる有用な評価体系を構築するべく、ワーキンググループを立ち上げた。本検討では、h-CLAT に加え、タンパク質と感作性物質の結合に着目した Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)、*in silico* system である DEREK を組み合わせた評価体系を構築し、適用範囲を考慮しつつ LLNA に対する予測精度の向上を検証した。

[方法]

LLNA で感作性の有無が明らかで、水溶解性に広い分布を有する(水溶解性が低い物質も含む)133品の化学物質を、h-CLAT、DPRA、DEREK で評価を行った。h-CLAT については、THP-1細胞に被験物質を24時間曝露した後にフローサイトメーターによって、細胞表面タンパク質 CD86 および CD54 の発現量を測定した。DPRA では、システイン、リジンを含むモデルペプチドと被験物質を混合し、24時間後に HPLC を用いて、モデルペプチドの減少率を測定した。DEREK では、被験物質の化学構造を代入しアラートの有無を確認した。

[結果、考察]

133品の化学物質を評価した結果、各試験の LLNA との一致率は、h-CLAT:78%、DPRA:74%、DEREK:74%であった。次に、各試験法の評価結果をスコア化し、総スコアから感作性を予測する Integrated Testing Strategy (以下、A)、各試験法を段階的に組み合わせた Tiered approach(以下、B)、重回帰解析に基づく評価体系(以下、C)の予測精度を検証した結果、LLNA との一致率はそれぞれ A:84%、B:81%、C:84%を示した。一方、各評価体系において偽陰性となった物質には、h-CLAT で最高試験濃度において無毒性の物質、もしくは細胞培地や緩衝液中で析出、分離する物質が認められた。被験物質の低水溶解性が偽陰性の原因となることが考えられたため、水溶解性を調べた結果、偽陰性となった物質のほとんどは、その分配係数(LogP)が3.5以上であった。LogP が3.5以上の物質を除く109品に関して、LLNA との一致率を算出したところ、A:88%、B:86%、C:87%となった。また、各評価体系における感度は A:96%、B:97%、C:100%となった。さらに、LLNA における感作性強度に関しては、全ての評価体系で73%の予測性を示した。本結果から、3つの評価体系のいずれにおいても LLNA における感作性の有無および感作性強度を精度良く予測できる可能性が示唆された。

[引用文献]

1). T. Ashikaga et al., 2010, ATLA, 38, 1-10

**Collaborative project in JCIA for evaluation of skin sensitization
using non-animal tests**

-Testing strategy with h-CLAT, DPRA and DEREK-

1, ¹¹Osamu Takenouchi, 2, ¹¹Shiho Fukui, 2, ¹¹Kenji Okamoto, 3, ¹¹Satoru Kurotani,
3, ¹¹Noriyasu Imai, 4, ¹¹Miyuki Fujishiro, 4, ¹¹Daiki Kyotani, 5, ¹¹Yoshinao Kato,
6, ¹¹Toshihiko Kasahara, 6, ¹¹Masaharu Fujita, 7, ¹¹Akemi Toyoda, 8, ¹¹Daisuke Sekiya,
8, ¹¹Shinichi Watanabe, 9, ¹¹Yoichi Seto, 10, ¹¹Morihiko Hirota,
10, ¹¹Takao Ashikaga, 1, ¹¹Masaaki Miyazawa

¹ Kao Corporation, ² Kanebo Cosmetics Inc., ³ KOSE Corporation,
⁴ COSMOS TECHNICAL CENTER CO., LTD.,
⁵ NIPPON MENARD COSMETIC CO., LTD., ⁶ FUJIFILM Corporation,
⁷ POLA CHEMICAL INDUSTRIES, INC.,
⁸ LION CORPORATION, ⁹ P&G Japan K.K., ¹⁰ SHISEIDO CO., LTD.,
¹¹ Working group for in vitro skin sensitization
in Japan Cosmetic Industry Association

[Objectives]

Recently, alternative methods have been developing due to animal welfare concerns, the forthcoming ban on animal testing in EU and the need of speedup of product development. However, the combination of several *in vitro* methods is important to replace the animal test (LLNA). Therefore, Japanese Cosmetic Industry Association started the working group in order to investigate several testing strategies and appeal their utilities. In this study, we verified the utility of the testing strategy: the combination of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) based on the activation of dendritic cells, Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) based on the reactivity of hapten against protein and the *in silico* system, DEREK.

[Materials and Methods]

A total of 133 chemicals, some of which have poor water-solubility, were evaluated by h-CLAT, DPRA and DEREK. For h-CLAT, THP-1 cells were exposed to each test chemical for 24 hours. After incubation, the protein expressions for CD86 and CD54 were analyzed by flow cytometry. For DPRA, model peptides were mixed with test chemical for 24 hours. The depletion of peptides was analyzed by HPLC.

[Results and Discussions]

Among 133 chemicals, the accuracy of h-CLAT, DPRA and DEREK with LLNA is 78, 74 and 74%, respectively. Next, we investigated 3 testing strategies: the ITS approach (A) which evaluates the sensitization from the final score calculated from the score of each alternative method, the tiered approach (B) using h-CLAT and DPRA, and the multiple regression analysis model (C). Each strategy demonstrated a high potential prediction (A:84%, B:81%, C:84%). Regarding false negative chemicals of each strategy, some chemicals did not induce any cytotoxicity in h-CLAT or the other chemicals were crystallized or separated in the culture medium and the buffer. Considered that the low water-solubility induced false negative, the logP values were estimated by EPI-suite. In the result, the log P values of false negative chemicals were mostly above 3.5. Then, regarding 109 chemicals except for water-insoluble chemicals, the accuracy with LLNA was improved to A:88%, B:86%, C:87%. The sensitivities of these strategies were A:96%, B:97%, C:100%. All strategy provided 73% for the potency prediction. This result suggests that testing strategy have high predictivities for both of the potential and potency regardless of the way to combine the h-CLAT, DPRA and DEREK.

粧工連における代替法を用いた皮膚感作性評価への取り組み（第2報）

—ニューラルネットワーク手法を用いた評価体系の構築—

1,11 廣田 衛彦、2,11 福井 志穂、2,11 岡本 賢二、3,11 黒谷 達、3,11 今井 教安、4,11 藤代 美有紀、4,11 京谷 大毅、5,11 加藤 義直、6,11 笠原 利彦、6,11 藤田 正晴、7,11 豊田 明美、8,11 関谷 大輔、8,11 渡辺 真一、9,11 瀬戸 洋一、10,11 竹之内 修、1,11 足利 太可雄、10,11 宮澤 正明

1)資生堂、2)カネボウ化粧品、3)コーセー、4)コスモステクニカルセンター、5)日本メナード化粧品(株)、6)富士フイルム(株)、7)ポーラ化成工業(株)、8)ライオン(株)、9)P&G ジャパン(株)、10)花王(株)、11)日本化粧品工業連合会 感作性試験代替法ワーキンググループ

【背景、目的】化合物の安全性評価の中で、感作性評価は主に動物を用いた試験 (guinea pig maximization test (GPMT)、murine local lymph node assay (LLNA)など) で評価され、特に LLNA については、感作性の強度評価 (リスクアセスメント) への活用例が最近報告されている。一方、EU 化粧品指令第 7 次改正や動物愛護の観点から、我々を含めた複数のグループより、様々な *in vitro* 感作性試験が開発されている。さらに近年、複数の *in vitro* 試験や *in silico* モデルの組み合わせによる感作性強度評価に関する検討が報告され、*in vitro* 試験を用いた感作性強度評価に関する関心が高まっている。感作強度評価体系の確立は化粧品業界共通の課題であることから、今回、日本化粧品工業連合会 (粧工連) の共同研究の一環として、複数の *in vitro* 試験の組み合わせによる感作性強度予測モデルの構築について検討した。

【方法】*In vitro* 感作性試験として、培養細胞 (THP-1 細胞) の CD86 及び CD54 発現を指標とした human Cell Line Activation Test (h-CLAT) や同じく THP-1 細胞の細胞表面-SH 基変化を指標とした SH test、Antioxidant Response Element (ARE) 領域とルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれた AREc32 細胞を用いた ARE アッセイ、システイン (Cys) またはリジン (Lys) を含むペプチドとハプテンの結合を指標とした Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) を用いた。組み合わせについて、各試験法から得られる特性値をニューラルネットワーク解析 (ANN 解析) に供して、LLNA の閾値 (EC3 または、非感作性物質の試験最高濃度) を予測するモデルを作成した。各試験法の特性値において、h-CLAT では CD86 及び CD54 発現の閾値濃度 (EC150 (CD86)、EC200 (CD54)、試験陰性の場合、CV75 値 (細胞毒性))、SH test における細胞表面-SH 基の変化量、ARE アッセイにおける最大相対発現量 (I_{max})、DPRA における変化量 (Cys 及び Lys を含むペプチドに対するハプテン結合量の平均)を使用した。

【結果、考察】被験物質数約 60 から作成した h-CLAT、SH test、ARE アッセイによる ANN モデル ($R=0.78$) と被験物質数 133 からなる h-CLAT 及び DPRA による ANN モデル ($R=0.72$) は共に概ね良好な予測性を示した。

以上の結果より、今回構築したモデルは感作性の強度評価に有効なことが示唆された。

**Collaborative project in JCIA for evaluation of skin sensitization using
non-animal tests (second report). - Development of evaluation system using
artificial neural network analysis -**

^{1, 11} Morihiko Hirota, ^{2, 11} Shiho Fukui, ^{2, 11} Kenji Okamoto, ^{3, 11} Satoru Kurotani,
^{3, 11} Noriyasu Imai, ^{4, 11} Miyuki Fujishiro, ^{4, 11} Daiki Kyotani, ^{5, 11} Yoshinao Kato, ^{6,}
¹¹ Toshihiko Kasahara, ^{6, 11} Masaharu Fujita, ^{7, 11} Akemi Toyoda, ^{8, 11} Daisuke Sekiya, ^{8,}
¹¹ Shinichi Watanabe, ^{9, 11} Hirokazu Seto, ^{10, 11} Osamu Takenouchi,
^{1, 11} Takao Ashikaga, ^{1, 11} Masaaki Miyazawa

¹ SHISEIDO CO., LTD., ² Kanebo Cosmetics Inc., ³ KOSE Corporation, ⁴ COSMOS
TECHNICAL CENTER CO., LTD., ⁵ NIPPON MENARD COSMETIC CO., LTD., ⁶
FUJIFILM Corporation, ⁷ POLA CHEMICAL INDUSTRIES, INC.,
⁸ LION CORPORATION, ⁹ P&G Japan K.K., ¹⁰ Kao Corporation, ¹¹ Working group
for *in vitro* skin sensitization evaluation in Japan Cosmetic Industry Association

[Background, Purpose] Skin sensitization potential has been evaluated by animal testing (e.g., guinea pig maximization test (GPMT), murine local lymph node assay (LLNA) and so on.). Especially about LLNA, recently there are the application to risk assessment for skin sensitization. Due to the EU cosmetic directive 7th amendment and animal protection, several groups including us have developed various types of *in vitro* sensitization assay. In addition, studies on prediction of skin sensitization potential by integrating of alternatives (both *in vitro* and *in silico* models) have been reported. That is suggesting that there is increasing concern about evaluation of skin sensitization potential by using *in vitro* tests. Because establishment of alternative evaluation system for skin sensitization potential is commonly essential matter in cosmetics industry, we are trying to developing of skin sensitization evaluation system by integrating several *in vitro* tests as an activity of JCIA.

[Methods] As *in vitro* skin sensitization tests, we used four methods; 1. the human Cell Line Activation Test (h-CLAT): detecting enhancement of CD86 and CD54 expression in THP-1 cells (EC150, EC200 and CV75). 2. the SH test: taking advantage of changing cell-surface thiols on THP-1 cells (maximum change rate). 3. the Antioxidant Response Element (ARE) assay measuring oxidative stress (I_{max}). 4. the DPRA measuring peptide binding (binding rate). Threshold values (EC3 or highest tested doses of non-sensitizers) from LLNA were estimated by artificial neural network (ANN) analysis using these *in vitro* skin sensitization tests.

[Results and Discussion] The ANN models obtained from these *in vitro* tests show good correlation with *in vivo* data.

These results suggested that combining of *in vitro* tests could be useful for evaluation of skin sensitization potential.

粧工連における代替法を用いた皮膚感作性評価への取り組み（第3報）

ーロジスティック回帰を用いた評価体系の構築ー

1,11 岡本 賢二、1,11 福井 志穂、2,11 黒谷 達、2,11 今井 教安、3,11 藤代 美有紀、
3,11 京谷 大毅、4,11 加藤 義直、5,11 笠原 利彦、5,11 藤田 正晴、6,11 豊田 明美、
7,11 関谷 大輔、7,11 渡辺 真一、8,11 瀬戸 洋一、9,11 廣田 衛彦、10,11 竹之内 修、
9,11 足利 太可雄、10,11 宮澤 正明

1)カネボウ化粧品、2)コーセー、3)コスモステクニカルセンター、
4)日本メナード化粧品(株)、5)富士フイルム(株)、6)ポーラ化成工業(株)、7)ライオン(株)、
8)P&G ジャパン(株)、9)資生堂、10)花王(株)、
11)日本化粧品工業連合会 感作性試験代替法ワーキンググループ

[背景、目的]

日本化粧品工業連合会では研究ワーキンググループを立ちあげ、皮膚感作性予測のためのデータセット拡充と予測モデルの検討を行なっている。ここでは、prevalidation が進行中である Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)と human Cell Line Activation Test (h-CLAT) のデータセットを用い、回帰及び決定木により作成したモデルの予測性能を報告する。

[方法]

作成したデータセットを用いてロジスティック回帰により murine local lymph node assay (LLNA)結果（陽性 / 陰性）を予測するモデルを作成した。ロジスティック回帰により得られた p 値と感作性強度に関連性が認められたため、p 値を用いて GHS 分類を行う決定木を作成した。予測性能は 10-fold cross validation により確認した。

[結果]

ロジスティック回帰分析を用いた LLNA 結果(陽性/陰性)の予測性能は、一致率 84.7%、予測性能の指標である ROC 曲線下面積(AUC)は 0.867 であった。p 値を用いた GHS 予測の一致率は 65.3%であった。

[考察、結論]

h-CLAT の複数のパラメータ、及び DPRA スコアによる回帰分析により得られた p 値は、感作性陽性の確率を表すだけでなく、感作性強度とも関連性があった。このような p 値の使用は、リスク評価における意思決定の一助となる。

**Collaborative project in JCIA for evaluation of skin sensitization using
non-animal tests (third report)**

-Using logistic regression model-

^{1, 11}Kenji Okamoto, ^{1, 11}Shiho Fukui, ^{2, 11}Satoru Kurotani, ^{2, 11}Noriyasu Imai,
^{3, 11}Miyuki Fujishiro, ^{3, 11}Daiki Kyotani, ^{4, 11}Yoshinao Kato, ^{5, 11}Toshihiko Kasahara,
^{5, 11}Masaharu Fujita, ^{6, 11}Akemi Toyoda, ^{7, 11}Daisuke Sekiya, ^{7, 11}Shinichi Watanabe,
^{8, 11}Hirokazu Seto, ^{9, 11}Morihiro Hirota, ^{10, 11}Osamu Takenouchi, ^{9, 11}Takao Ashikaga,
^{10, 11}Masaaki Miyazawa

¹ Kanebo Cosmetics Inc., ² KOSE Corporation,
³ COSMOS TECHNICAL CENTER CO., LTD.,
⁴ NIPPON MENARD COSMETIC CO., LTD., ⁵ FUJIFILM Corporation,
⁶ POLA CHEMICAL INDUSTRIES, INC., ⁷ LION CORPORATION,
⁸ P&G Japan K.K., ⁹ SHISEIDO CO., LTD., ¹⁰ Kao Corporation,
¹¹ Working group for *in vitro* skin sensitization evaluation
in Japan Cosmetic Industry Association,

[Background and Purpose] The Japan Cosmetic Industry Association has launched a research working group aiming to develop the prediction model for skin sensitization potency. The objective of this study was to confirm the predictive performance obtained using a logistic regression and decision tree analysis of human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) results.

[Methods] The logistic regression analysis was performed using a dataset for 133 chemicals obtained via a local lymph node assay (LLNA), h-CLAT, and DPRA. LLNA results were selected outcome variable. It was confirmed that the p value of logistic regression has a relationship to GHS classification results; therefore we made the decision tree classifier that performs the classification via p value. A 10-fold cross validation was performed.

[Results] Use of the logistic regression analysis for the prediction of LLNA results yielded a predictive performance with an accuracy rate of 84.7% and a area under the ROC curve of 0.867. The decision tree classifier for the predication of GHS classification results yielded predictive performance with an accuracy rate of 65.3%.

[Discussion and Conclusion] The use of the logistic regression model provides a predicted probability of positive results and the probability is associated with GHS classification results.