

皮膚感作性試験評価報告書

ARE-Nrf2 Luciferase Test Method

角化細胞株レポーターアッセイ

平成 27 年 4 月 28 日

JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会

JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会

委員長 筒井尚久（田辺三菱製薬株式会社）

委員 安達玲子（国立医薬品食品衛生研究所）

金澤由基子（一般財団法人 食品薬品安全センター）

小島幸一（一般財団法人 食品薬品安全センター）

佐藤一博（国立大学法人 福井大学）

武吉正博（一般財団法人 化学物質評価研究機構）

森本隆史（住友化学株式会社）

要旨

皮膚感作性は化学物質の安全性評価において重要な評価項目であり、従来、モルモットやマウスを用いた動物実験によって評価されてきた。近年 EU における欧州化学品規制では、安全性評価はコンピューターを用いた定量的構造活性相関 (QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationship) モデルや *in vitro* 試験の代替法が推奨されており、動物実験により安全性評価された成分を含む化粧品の輸入販売が禁止されたことから (2013 年 3 月全面施行)、動物を用いない *in vitro* 試験法の開発が強く望まれている。ARE (Antioxidant response element)-Nrf2¹ Luciferase Test Method は、多くの皮膚感作性物質が ARE により制御される遺伝子の発現を誘導することを利用し、この誘導活性について培養細胞を用いてアッセイする試験法である。本報告書は、この ARE-Nrf2 Luciferase Test Method について、本試験法を開発した Givaudan 社の先行バリデーション試験の成績並びに EURL ECVAM (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing) 科学諮問委員会 (ESAC) により実施された第三者評価報告書などを基にその手順を纏め、有用性と限界を評価したものである。

ARE-Nrf2 Luciferase Test Method (以下、本試験法と記す) は、感作性発現機序における第二段階のイベントであるケラチノサイトにおける炎症反応および Nrf2-Keap1²-ARE pathway を利用した試験法であり、化学物質の感作性を判断する上で重要な情報を与えてくれる。

マウスを用いる試験法である局所リンパ節試験 (LLNA: Local Lymph Node Assay) の約 1/7 程度のランニングコストで実施可能であり、*in vitro* 試験法であることから、有用性は高い。しかしながら、現時点で本試験法に使用できることが知られている細胞系は KeratinoSensTM のみであり、その使用には本細胞系を樹立した Givaudan 社からライセンスを受けることが必要なため、新規導入の容易な試験系とは言い難い。

本試験法の先行バリデーション試験における施設内再現性は、5 施設中 1 施設において、GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) 区分 1B に分類される物質 (弱い感作性物質) および非感作性物質で再現性が得られなかったため、目安とした達成基準 (85%) に達しておらず、強い感作性物質以外では判定がぶれる懸念がある。一方、施設間再現性は、目安とした達成基準 (80%) を上回った。

本試験法の感度は、約 80% であり、陰性の結果が得られた場合は、偽陰性の可能性を考慮し、補完し得る他の試験によって確認しなければならず、本試験法のみで皮膚感作性を陰性と判定することはできない。また、特異度も、約 80% であることから、陽性の結果が得られた場合にも、偽陽性の結果が生じる可能性があることに留意しなければならない。

本試験法では、活性化に代謝系を必要とする化学物質は、正しくその感作性が検出されない可能性がある。また、細胞系であるため、疎水性の高い物質では規定されている最高

¹ Nrf2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

² Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1

濃度 (2000 μM) での評価が難しく、陰性判定が下せない場合がある。

以上を踏まえ、本委員会は、本試験法が皮膚感作性評価に汎用されるためには、KeratinoSens™ が安価に入手できることが前提と考える。また、本試験法の様々な限界を考慮すると、本試験法単独では皮膚感作性の評価は不十分であり、証拠の重み付けや他の試験法 (LLNA、モルモットを用いる皮膚感作性試験など) と組み合わせでの評価を推奨する。

1. 緒言

皮膚感作性を評価することは化学物質の安全性評価において重要である。化学物質の皮膚での接触感作性のリスクを動物で予測する試験法としてモルモットを用いる皮膚感作性試験 (OECD TG406) やマウスを用いる局所リンパ節試験 (LLNA: Local Lymph Node Assay, OECD TG429) がある。この [^3H -Methyl]-thymidine 取込量を測定する LLNA 以外に放射性同位元素 (RI) を用いず ATP 量を測定する LLNA:DA (OECD TG442A) や Bromodeoxyuridine 量を測定する LLNA:BrdU-ELISA (OECD TG442B) がある。このように、現在 OECD からガイドラインとして公表されている試験法は、動物を用いた *in vivo* の試験法のみである。

EU における欧州化学品規則 (REACH: Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) では、安全性評価はコンピューターを用いた定量的構造活性相関 (QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationship) モデルや *in vitro* 試験等による代替法が推奨されており、動物実験により安全性が評価された成分を含んだ化粧品の輸入および販売が禁止された (2013 年 3 月全面施行)。そのため、化学物質の皮膚感作性を評価する代替法の開発が強く求められている。

現在、ペプチドとの結合反応を利用した Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)、単球系細胞の活性化を利用した human Cell Line Activation Test (h-CLAT) および Myeloid U937 Skin Sensitization Test (MUSST)、ケラチノサイト細胞系の標的遺伝子を用いた ARE-Nrf2 Luciferase Test Method などの皮膚感作性試験の動物を用いない動物実験代替法が提案されており、EURL ECVAM (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing) 等においてバリデーション研究が行われている。

ARE(Antioxidant response element)-Nrf2 Luciferase Test Method は、多くの皮膚感作性物質が ARE により制御される遺伝子の発現を誘導することを利用し、この誘導活性について培養細胞を用いて評価する試験法である。KeratinoSens™ 法は本試験法のために確立された細胞を使用する評価系である。KeratinoSens™ 法を用いて実施された本試験法のバリデーション研究の結果については、EURL ECVAM 科学諮問委員会 (ESAC) による第三者評価が完了している¹⁾。

JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会 (以下、本委員会) が ARE-Nrf2 Luciferase Test Method の皮膚感作性試験代替法としての科学的妥当性について、KeratinoSens™ 法を用いて実施された本試験法のバリデーション研究の結果等、現在までに公開されている情報をもとに評価したので、その結果を報告する。

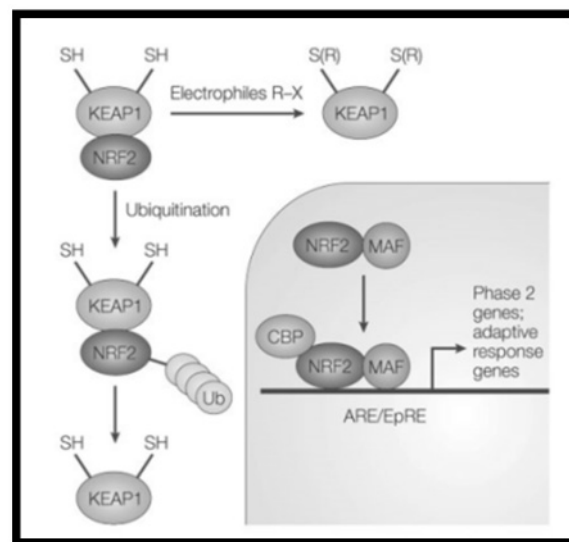
2. 試験法の原理

皮膚感作性は、ヒトでは接触皮膚炎、動物（齧歯類）では接触過敏症として知られる化学物質の毒性の一つである。OECD がまとめた Adverse Outcome Pathway (AOP) では、化学物質による皮膚感作性は次の 4 つの Key event から成るとされている¹⁾。

- 1) 化学物質とタンパク質のシステイン残基あるいはリジン残基との共有結合
- 2) ケラチノサイトにおける炎症性応答および ARE-dependent pathway による遺伝子発現
- 3) 樹状細胞の活性化(特異的細胞表面マーカーの発現、ケモカインやサイトカインの産生)
- 4) リンパ節における T 細胞の増殖

ARE-Nrf2³ Luciferase Test Method は上記の第 2 の Key event に対応する試験法である。その基本的原理は Nrf2-Keap1⁴-ARE pathway (図 1) を利用したレポーターアッセイである¹⁾。

図 1. Nrf2-Keap1-ARE pathway の模式図



Nrf2-Keap1-ARE pathway は、転写因子 Nrf2、Nrf2 の抑制因子である Keap1 および ARE が関係する遺伝子発現経路である。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化学物質が結合すると、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、化学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。

ARE-Nrf2 Luciferase Test Method では、AKR1C2 遺伝子（樹状細胞において皮膚感作性物質により発現誘導される遺伝子の 1 つ）の ARE を融合させた SV40 プロモーターを有するルシフェラーゼ遺伝子のプラスミドを安定的に導入した HaCaT 細胞（ヒトケラチノサイト

³ Nrf2 :Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2

⁴ Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1

系培養細胞株）を用いる。化学物質により 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、化学物質の皮膚感作性を評価する。

3. 試験手順／判定

試験手順は特に示さない限り KeratinoSens™ を用いた場合の記載である。ケラチノサイト由来 ARE-Nrf2 ルシフェラーゼレポーター遺伝子（keratinocyte-based ARE-Nrf2 luciferase reporter gene）を用いた本試験法の細胞として KeratinoSens™ 以外の細胞を用いる場合は、OECD 作成の ARE-Nrf2 LuciferaseTest Method に関する Performance Standard（案）²⁾に従い KeratinoSens™ を用いた場合と同等かあるいは優る信頼性、正確度、感度、特異度などを示すことを確認したのちに使用しなければならない。いずれの場合も日常的に用いる前に OECD ガイドライン（案）³⁾の Annex 2 に従い技術的熟達度を確認することを推奨する。

3-1. 細胞の調製

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。（現在は、KeratinoSens™ のみであるため、試験法の開発者と使用許諾契約を結んだうえでこの細胞系を入手して使用することになる）。指定された継代数の細胞（2 から 4 代）を増殖し、分割して保管し、これを主ストック細胞とする。主ストック細胞から増殖させ、指定された継代数（25 代）以内で試験に使用する。試験前日に 80～90%コンフルエントになった培養フラスコから調製した均一な細胞液を 4 枚（3 枚はルシフェラーゼ活性測定、1 枚は生細胞数測定）の 96 ウェルプレートに播種（10,000 cells / well）する。

3-2. 被験物質および対照物質の調製

原則として、試験当日の調製とする。

被験物質は DMSO に溶解して 200 mM の溶液を調製する。DMSO に不溶の場合は滅菌水あるいは培養液にて同様に調製し、その溶液は、滅菌（例えば濾過）する。分子量が不明の被験物質の場合は 40 mg/mL あるいは 4%（W/V）の溶液とする。これらの溶液を DMSO（不溶の場合は滅菌水または滅菌培養液）で倍々希釈して 12 段階の濃度（0.098～200 mM）溶液を調製する。

陰性対照（媒体）は 1 プレートあたり 6 ウェル分を同様に調製する。

陽性対照は Cinnamic Aldehyde（CAS No: 14371-10-9, trans-3-Phenyl-2-propenal, trans-Cinnamaldehyde）を用い、DMSO に溶解して 200 mM の溶液を調製し、さらに DMSO で希釈して 6.4 mM とする。この溶液から DMSO で倍々希釈をして 5 段階の濃度（0.4～6.4 mM）溶液を調製する。

さらに、すべての溶液を血清含有培養液で 25 倍希釈する。これらの調製溶液を各ウェルに加える（「被験物質等の適用」参照）と、最終濃度は被験物質で 0.98～2000 μM、陽性対

照で 4~64 μM となる。陰性対照の DMSO の最終濃度は他の調製液と同じ 1%となる。

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、細胞の前培養（継代数は同じもの）も繰り返し測定ごとに行う。

3-3. 被験物質等の適用

24 時間培養後の 4 枚のプレートの培養液を捨て、1 ウエルあたり 150 μL の血清含有培地（抗生物質不含）で置き換える。調製した被験物質溶液等を 50 μL ずつ各ウエルに加え、48 時間、 $37\pm 1^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 インキュベータ内で培養する。ただし、1 ウエルは無処置（無細胞、空ウエル）とする。ウエルからの蒸発や交差汚染を避けるためにプレートごとに遮蔽する。

3-4. ルシフェラーゼ活性の測定

適切なルシフェラーゼ活性の測定には、1) 感度の良いルミノメータ、2) 光の交差による測定の妨害を防ぐに十分なウエルの高さを持ったプレート、3) 十分な感度とバラツきの低い測定値を得るためのルシフェラーゼ基質の選択が重要である。これらを確認するために Annex 3³⁾に示されたセットアップ方法を試験前に確認することを勧める。

培養終了後、上清を捨て、リン酸緩衝化生理食塩水で一度洗う。細胞溶解用緩衝液を各ウエルに加え、室温で 20 分間処理する。細胞溶解物を含むプレートをルミノメータで測定するため、各ウエルにルシフェラーゼの基質液 50 μL を加え、1 秒待ち、2 秒間の発光量を積算する。

3-5. 細胞生存率の測定

細胞の生存率を測定するプレートは、培養終了後に培地を MTT（3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue tetrazolium bromide; CAS No. 298-93-1) 含有新鮮培地に交換する。4 時間、 37°C 、5% CO_2 インキュベータ内で培養する。培養後、MTT 含有培地を捨て、10%SDS(Sodium Dodecyl Sulphate)溶液などで一夜細胞溶解後、600 nm の吸光度を測定する。

3-6. 測定値から以下のパラメーターを求める。

- ・被験物質およ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： I_{max}
- ・ルシフェラーゼ活性の誘導が溶媒対照の 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： $\text{EC}_{1.5}$
- ・細胞生存率が 50%および 30%減となる濃度： IC_{50} および IC_{30}

ルシフェラーゼ活性の誘導倍率（Fold induction）は式 1 から求める。全体の最大誘導倍率は、個々の繰り返し測定の平均として求める。

$$\text{式 1} \quad \text{Fold induction} = (L_{\text{sample}} - L_{\text{blank}}) / (L_{\text{solvent}} - L_{\text{blank}})$$

L_{sample} : 被験物質の発光強度

L_{blank} : 無細胞、無処置の対照ウエルの発光強度

$L_{solvent}$: 細胞と溶媒からなるウエルの平均発光強度

EC_{1.5} は式 2 により線形補間に基づいて求める。全体の EC_{1.5} は、個々の繰り返し測定 of 幾何学的平均で求める。

$$\text{式 2} \quad EC_{1.5} = (C_b - C_a) \times \{(1.5 - I_a) / (I_b - I_a)\} + C_a$$

C_a : 1.5-fold induction を超えた最低濃度 (μM)

C_b : 1.5-fold induction 未満の最高濃度 (μM)

I_a : 1.5-fold induction を超えた最低濃度での fold induction (3 回測定の平均)

I_b : 1.5-fold induction 未満の最高濃度での fold induction (3 回測定の平均)

生存率 (Viability) は式 3 から求める。

$$\text{式 3} \quad Viability = (V_{sample} - V_{blank}) / (V_{solvent} - V_{blank}) \times 100$$

V_{sample} : 被験物質のウエルの MTT 吸光度

V_{blank} : 無細胞、無処置の対照ウエルの MTT 吸光度

$V_{solvent}$: 細胞と溶媒からなるウエルの平均 MTT 吸光度

IC₅₀ と IC₃₀ は式 4 により線形補間に基づいて求める。全体の IC₅₀ と IC₃₀ は、個々の繰り返し測定 of 幾何学的平均で求める。

$$\text{式 4} \quad IC_x = (C_b - C_a) \times \{[(100 - x) - V_a] / (V_b - V_a)\} + C_a$$

x : 濃度を求める減少率

C_a : 細胞生存率 $x\%$ 減を超えた最低濃度 (μM)

C_b : 細胞生存率 $x\%$ 減未満の最高濃度 (μM)

V_a : 細胞生存率 $x\%$ 減を超えた最低濃度における生存率

V_b : 細胞生存率 $x\%$ 減未満の最高濃度における生存率

1.5-fold induction を超えた各濃度について、ルシフェラーゼ活性の誘導が統計学的に陰性対照に対して有意 ($p < 0.05$) であるかを検証する。グラフを作成して視覚的に確認することも推奨する。明らかな濃度依存性が認められない場合、濃度反応曲線が二相性を示す場合には、測定を繰り返し、被験物質特異的か、測定エラーなのかを確認する。二相性であることが確認できた場合は、より低い EC_{1.5} 値を選択する。

3-7. 測定成立条件

以下の 3 条件をすべて満たす場合に成立する。

- 1) 陽性対照の Cinnamic Aldehyde は陽性でなくてはならない。すなわち、陽性対照の誘

導は少なくとも 1 濃度で 1.5 の閾値以上で統計学的に有意でなくてはならない。

- 2) Cinnamic Aldehyde の $EC_{1.5}$ 値はヒストリカルデータ (7 μM と 30 μM の間のバリデーションデータに基づき定期的に更新すること) の平均の 2 標準偏差値以内であることと、64 μM の Cinnamic Aldehyde の 3 プレーットの平均の Fold induction は 2 から 8 の間にあることを確認する。後者が満たされない場合は、Cinnamic Aldehyde によるルシフェラーゼ活性の誘導と濃度依存性の関連を慎重に確認し、濃度依存性が明らかな場合に受け入れられる。
- 3) 3 プレーットの 6 ウェルの溶媒対照 (合計 18 ウェル) の平均変動係数が 20% 以下であることが必要で、これよりも高い場合は無効とする。

3-8. 陽性の判定

2 回の繰り返し実験の 2 回あるいは 3 回の繰り返し実験の 2 回で、以下のすべての条件に合致した場合に被験物質は感作性物質と判断する。

- 1) $I_{\max}$ 値が 1.5 倍誘導よりも大きく溶媒対照に比較して統計学的に有意であること。
- 2) 1.5 倍以上の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、細胞生存率は 70% 以上であること。
- 3) $EC_{1.5}$ 値が 1000 μM 未満 (分子量未知の場合は 200 mg/mL 未満) であること。
- 4) ルシフェラーゼの誘導に明らかな全体的濃度依存性があること。

1) から 3) のいずれもが満たされたが、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、結論は下せず、さらに繰り返しの実験が必要となる。1000 μM 未満 (分子量未知の場合は 200 mg/mL 未満) で陰性の場合も結論は下せない。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 (例えば 1.33 あるいは 1.41) を用いて、誘導が細胞毒性濃度で起こるのか否かを定めることが必要である。

4. 精度

Givaudan 社の先行バリデーション研究⁴⁾において、技術移転性、施設内再現性および施設間再現性が検討されている。

4-1. 技術移転性 (表 1)

7 物質を用いて主導施設の Givaudan 社から Procter&Gamble 社、Beiersdorf 社、Institute for in vitro science (IIVS) および BASF の 4 施設への技術移転性について評価が行われた。その結果、直接の技術指導をせずに SOP の提供だけで技術移転は可能であった。

GHS(Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)で区分 1A に分類される 2,4-Dinitrochlorobenzene および Citral、GHS で区分 1B に分類される Ethylene glycol

dimethacrylate は、全 5 施設 3 回繰り返し行った試験の結果はすべて陽性であった。一方、GHS で区分 1B に分類される Hexyl cinnamic aldehyde は 2 施設で 3 回中 3 回陽性であったが、主導施設を含む 3 施設ではすべて陰性あるいは、陽性 1 回、陰性 2 回の混在した判定結果を示した。非感作性物質である Chlorobenzene、Methyl salicylate および Sulfanilamide はすべての施設で陰性であったが、3 回繰り返し中 1 回陽性の判定を示す施設があった。これらの結果は、主導施設が想定した範囲内の結果であると推測されるため、技術移転性に問題はないと考えられる。

表 1 技術移転性の評価成績

No.	Chemical Name	CAS	GHS potency category	Positive with EC 1.5 up to 1000 µM					
				Lead Lab. Histological Data	Lead lab.	Lab.1	Lab.2	Lab.3	Lab.4
1	2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	1A	2 of 2	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
2	Citral	5392-40-5	1A	2 of 2	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
3	Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	1B	2 of 2	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
4	Hexyl cinnamic aldehyde	101-86-0	1B	2 of 2	1 of 3	0 of 3	1 of 3	3 of 3	3 of 3
5	Chlorobenzene	108-90-7	No	0 of 2	0 of 3	0 of 3	0 of 3	0 of 3	1 of 3
6	Methyl salicylate	119-36-8	No	0 of 2	0 of 3	1 of 3	0 of 3	1 of 3	1 of 3
7	Sulfanilamide	64-74-1	No	0 of 2	0 of 3	0 of 3	0 of 3	1 of 3	0 of 3

4-2. 施設内再現性（表 2）

ブラインド下で評価された 21 物質において、5 施設の施設内再現性（3 回の繰り返しの試験で同じ結果）は、主導施設：90.5%、試験施設 1：90.5%、試験施設 2：95.2%、試験施設 3：95.2%、試験施設 4：81.0%であった。本試験では、達成基準は設定されていないため、DPRA のバリデーション研究で採用された 85%を目安に考えた場合、5 施設中 4 施設がこの基準を上回った。基準に達しなかった試験施設 4 において再現性の得られない物質は、GHS で区分 1B に分類される Eugenol、Phenyl benzoate、および非感作性物質である Diethyl phthalate および Sodium lauryl sulfate であった。

ただし、本評価に使用された皮膚感作性陽性物質の内訳は、GHS で 1A に分類される物質が 11 物質に対し、施設内で再現性が得られない場合のある 1B に分類される物質が 4 物質と偏りがあることは留意すべき点と考える。

4-3. 施設間再現性（表 2）

ブラインド下で評価された 21 物質の 5 施設の施設間再現性（5 施設で同じ結果）は 85.7%であった。本先行バリデーション研究では、達成基準は設定されていないため、DPRA のバリデーション研究で採用された 80%を目安に考えた場合、この基準を上回った。

施設内再現性と同様に、本評価に使用された皮膚感作性陽性物質の内訳に偏りがあることは留意すべき点と考える。

表 2 施設間変動および施設内変動の評価成績

No.	Chemical Name	CAS	GHS potency category	Positive with EC 1.5 up to 1000 µM					Between Laboratory Reproducibility
				Lead lab.	Lab.1	Lab.2	Lab.3	Lab.4	
1	2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	1A	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	Y
2	4-Methylaminophenol sulphate	55-55-0	1A	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	Y
3	4-Nitrobenzylbromide	100-11-8	1A	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	Y
4	4-Phenylenediamine	106-50-3	1A	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	Y
5	(5-Chloro)-methylisothiazolinone	26172-55-4	1A	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	Y
6	Cinnamic aldehyde	104-55-2	1A	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	Y
7	Isoeugenol	97-54-1	1A	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	Y
8	Glyoxal	107-22-2	1A	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	Y
9	Methyldibromo glutaronitrile	35691-65-7	1A	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	Y
10	Oxazolone	15646-46-5	1A	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	Y
11	Tetramethylthiuramdisulfide	137-26-8	1A	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	Y
12	Cinnamyl alcohol	104-54-1	1B	3 of 3	2 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	Y
13	Eugenol	97-53-0	1B	1 of 3	1 of 3	3 of 3	3 of 3	1 of 3	N
14	Imidazolidinyl urea	39236-46-9	1B	2 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3	Y
15	Phenyl benzoate	93-99-2	1B	0 of 3	0 of 3	0 of 3	0 of 3	1 of 3	Y
16	Diethyl phthalate	84-66-2	No	0 of 3	0 of 3	1 of 3	0 of 3	2 of 3	N
17	Isopropanol	67-63-0	No	0 of 3	0 of 3	0 of 3	0 of 3	0 of 3	Y
18	Glycerol	56-81-5	No	0 of 3	0 of 3	0 of 3	0 of 3	0 of 3	Y
19	Lactic acid	50-21-5	No	0 of 3	0 of 3	0 of 3	0 of 3	0 of 3	Y
20	Salicylic acid	69-72-7	No	0 of 3	0 of 3	0 of 3	0 of 3	0 of 3	Y
21	Sodium lauryl sulfate	151-21-3	No	3 at cytotox.conc.	1 at cytotox.conc.	1 at cytotox.conc.	1 at cytotox.conc.	3 of 3	N
Within Laboratory Reproducibility				90.5%(19/21)	90.5%(19/21)	95.2%(20/21)	100%(21/21)	85.7%(18/21)	85.7%(18/21)

5. 正確度（感度および特異度）

Givaudan 社の先行バリデーション研究⁴⁾においてブラインド下で評価された 21 物質を基に GHS 分類との一致度、感度および特異度に関する評価を行った。

実施 5 施設の成績の積算による感度 (Sensitivity) は 89.3%、特異度 (Specificity) は 93.3%、正確度 (Accuracy) は 90.5%であった。試験施設毎の成績は、主導施設および試験施設 1：感度 86.7%、特異度 100%、正確度 90.5%、試験施設 2 および 3：感度 93.3%、特異度 100%、正確度 95.2%、試験施設 4：感度 86.7%、特異度 66.7%、正確度 81.0%であった。

本試験法の正確度に関して開発施設である Givaudan 社から提出されたヒストリカルデータでは 92.9%と報告されている。また、初期の評価物質数が不十分であるとの ESAC のコメントを受け、Givaudan 社が実施した 67 物質（感作性物質 44、非感作性物質 23）と、さらに追加で実施した物質を含む 114 物質（感作性物質 86、非感作性物質 28）での評価結果は⁴⁾、67 物質：感度 86.4%、特異度 82.6%、正確度 85.1%、114 物質：感度 76.7%、特異度 82.1%、正確度 78.1%であった。さらに、Natsch ら⁵⁾の 145 物質を用いた試験では、感度 77%、特異度 79%、正確度 72%であった。また、表 3 に示す通り、GHS で 1A に分類される物質を誤って陰性と判断することはなかった。

表 3 GHS 区分 1A 物質の成績

Chemical	Cas no.	GHS 分類	Imax			
			2008 ⁶⁾	2010 ⁷⁾	2011 ⁸⁾	INVITTOX ⁴⁾
Citral	5392-40-5	1A	9.8	96.4	22.3-104.4	96.4
Tetramethylthiuram disulfide	137-26-8	1A	ND	6.8	8.1-67.9	6.8
Cinnamic aldehyde	104-55-2	1A	31.6	16.2	9.8-44.7	16.2
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	1A	10.9	8.8	4.9-64.1	8.8
Glyoxal	107-22-2	1A	ND	28.2	14.5-195.0	28.2
Isoeugenol	97-54-1	1A	60.2	6.4	9.5-56.8	6.4
1,2-Dibromo-2,4-dicyanobutane	35691-65-7	1A	ND	4.0	2.1-7.8	4.0
4-(Methylamino)phenol sulfate	55-55-0	1A	32.4	5.9	4.5-12.2	10.3
1,4-Phenylenediamine	106-50-3	1A	12.7	26.8	19.4-45.2	26.8
4-Nitrobenzyl bromide	100-11-8	1A	ND	6.9	4.7-14.0	6.9
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	97-00-7	1A	12.3	14.8	4.3-19.5	14.8
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	26172-55-4	1A	7.2	7.2	4.8-13.5	7.2
Oxazolone	15646-46-5	1A	2.3	2.4	6.4-46.3	2.4

ND: Not determined

6. 評価可能な物質の範囲

Emter らが報告しているように⁶⁾、様々な構造を有する化学物質の皮膚感作性の予測が可能である（表 4）。ただし、溶解性や溶媒中での安定性（例えば、溶媒中での加水分解）が問題で評価不可能となる物質が存在する。具体的には、LogP が 7 以上の強疎水性分子は DMSO と水への溶解特性から試験ができない。一方、LogP が 5 までの化学物質は、水あるいは DMSO に可溶なため、容易に試験が可能である。酸無水物は、システイン残基ではなくリジン残基と反応特徴があり、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考えられる。さらに、酸化反応や酸化的脱アミノ反応を必要とする多くのプレハプテンを正しく判定できるが、P450 による活性化が必要と推定されるプロハプテンは検出できない（KeratinoSensTM の由来細胞である HaCaT 細胞は薬物代謝酵素活性を有するが限定的である）。ルシフェラーゼ酵素に干渉する化学物質も評価に影響する³⁾。

表 4 Emter らの報告

Chemical Name	LLNA EC3	KeratinoSens results			Chemical Name	LLNA EC3	KeratinoSens results		
		ARE I _{max}	ARE EC _{1.5}	ARE IC ₅₀			ARE I _{max}	ARE EC _{1.5}	ARE IC ₅₀
Sensitizers					Non-sensitizers				
Oxazolone	0.003	2.4	175.5	1370.9	Sodium lauryl sulfate	var.	1.2	n.i.	44.7
Benzoquinone	0.01	15.2	6.5	104.5	Salicylic acid	var.	1.1	n.i.	>2000
(5-Chloro)-Methylisothiazolinone	0.01	7.2	8.7	7.1	Methyl salicylate	var.	1.2	n.i.	>2000
2,4-Dinitrochlorobenzene	0.05	14.8	2.5	8.2	Sulfanilamide	NC	1.4	n.i.	>2000
4-nitrobenzyl bromide	0.05	6.9	1.3	9.1	Diethyl phthalate	>100%	1.1	n.i.	>2000
4-phenylenediamine	0.11	26.8	5.0	438.9	Glycerol	>100%	1.2	n.i.	>2000
Glutaraldehyde	0.12	80.7	24.3	242.6	Propylene glycol	>100%	1.2	n.i.	>2000
Benzoyl peroxide	0.22	1.4	n.i.	567.6	Benzoic acid	>20%	1.1	n.i.	>2000
Glyoxal	0.75	28.2	89.1	677.9	1-Butanol	>20%	1.1	n.i.	>2000
4-Methylaminophenol sulphate	0.80	5.9	9.4	11.7	4-Hydroxybenzoic acid	>25%	1.1	n.i.	>2000
Formaldehyde	0.84	16.9	63.2	201.6	Sulfanilic acid	>25%	1.3	n.i.	>1000
Methyldibromo glutaronitrile	0.90	4.0	7.8	25.6	Tartaric acid	>25%	1.2	n.i.	>2000
Cinnamic aldehyde	1.3	16.2	16.1	194.4	Propylparaben	>25%	9.7	14.5	813.1
2-Hydroxyethyl acrylate	1.4	54.9	32.3	207.2	Ethyl vanillin	>50%	5.4	161.7	>2000
Isoeugenol	1.5	6.4	16.1	731.4	Isopropanol	>50%	1.2	n.i.	>2000
Ethylenediamine	2.2	13.2	99.9	>2000	Benzyl alcohol	>50%	1.2	n.i.	>2000
Benzylidene Acetone	2.2	503.9	9.7	174.5	Dimethylisophthalate	NC	2.1	694.9	>2000
Methyl-2-nonylnoate	2.5	33.1	1.8	121.9	Dextran	NC	1.5	n.i.	>2000
2-Mercaptobenzothiazole	2.5	8.8	48.1	1003.1	Tween 80	NC	2.7	19.3	399.8
Benzyl salicylate	2.9	5.5	8.4	111.0	Chlorobenzene	Neg	1.2	n.i.	>2000
Tetramethylthiuramdisulfide	3.1	6.8	0.8	39.1	Lactic acid	Neg	1.3	n.i.	>2000
Diethylenetriamine	3.3	1.7	1259.4	>2000	Phenol	Neg	1.3	n.i.	>2000
Thioglycerol	3.5	1.5	n.i.	>2000	Benzaldehyde	>25	2.3	443.1	>2000
Phenylacetaldehyde	4.5	11.3	28.5	116.2	Octanoic acid	>50	1.1	n.i.	>2000
Resorcinol	5.9	1.0	n.i.	>2000	n.i.: no significant induction above threshold				
Dihydroeugenol	6.8	1.5	462.0	759.2	ver.: Variable results				
Benzoisothiazolione	7.8	24.0	3.2	50.9	NC: Level not specified				
Citral	9.8	96.4	23.2	182.8	Neg: Negative reference according to D. Basketter. Food Chem. Toxicol. 37, 1167-1174				
Hexyl cinnamic aldehyde	9.9	2.7	17.3	26.3					
Eugenol	10.1	1.3	n.i.	1505.7					
Abietic acid	11.6	11.4	16.6	104.6					
Phenyl benzoate	13.6	1.3	n.i.	191.6					
Lyril HMPCC	17.1	16.1	79.6	355.4					
Benzocaine	17.1	3.0	18.2	>2000					
Benzyl cinnamate	18.4	8.7	11.0	>2000					
2,4-Dichloronitrobenzene	20.0	2.9	68.3	816.0					
Cinnamyl alcohol	21.0	1.7	123.6	774.6					
Hydroxycitronellal	23.0	137.1	79.4	>2000					
Imidazolidinyl urea	24.0	2.9	45.4	90.4					
Butyl glycidyl ether	30.9	340.7	218.5	>2000					
Ethylene glycol dimethacrylate	32.9	188.4	57.4	1655.8					
Cobalt chloride	Pos.	23.3	298.6	1330.2					
Nickel sulfate	var.	4.2	329.0	998.7					

7. 有用性と限界

本試験法は、細胞培養の技術と 96 ウェル対応のルミノメーターの使用技術があれば容易に実施可能である。KeratinSens™ 法および LLNA に関する費用の試算では、LLNA では 1 物質当たりのランニングコストが約 10 万円であるのに対し、KeratinSens™ 法では 1 物質について 12 濃度で三重測定、かつ 3 回の繰り返し実験の場合のランニングコストは約 1.3 から 1.5 万円である。実験期間も LLNA より短期間で実施可能であることから、経済性・簡便性の面から有用と考えられる。しかしながら、現時点でこの測定に使用できることが知られている細胞系は KeratinSens™ のみである。その使用には、本細胞系を樹立した Givaudan 社からライセンスを受けることが必要と考えられるが、費用も含めその条件の詳細はわかっていない。一方、KeratinSens™ を使用しない場合には、同等の細胞系を樹立し、OECD 作成の本試験法に関する performance standard (案)²⁾に従い、妥当性を評価した上で使用しなければならず、相応の費用と時間が必要なが容易に想像される。

細胞培養技術に熟練した研究者であれば、自動化した機器を使用しなくても、少なくとも 1 物質 12 段階の濃度で 42 物質の三重測定の実験を 1 週間で実施でき、さらにこれを 3

回の繰り返しで実施すると、42物質について3週間で完全な結果を得ることができるため、ハイスループットの試験法と考えられる。自動化された機器を用いれば更なる効率化も可能である。

EURL ECVAM が実施した LLNA との感作性の有無の比較⁷⁾では、正確度が 77% (155/201)、感度 78% (71/91)、特異度 76% (84/110) であり、Natsch ら⁶⁾の 145 物質を用いた試験でも同様の結果 (77%, 79%, 72%) が得られている。本試験法は感作性物質と非感作性物質を分別するのに加えて、用量-反応情報を得るのにも寄与する可能性があるとの報告があるが、現時点でその根拠は十分とは言えない。

本試験法は多成分あるいは混合物でも技術的には適用可能であるが、実施例がないため、慎重な判断が必要である。また、2000 μM を最高濃度として試験を実施するが、貧溶解性を示す物質において、この最高濃度での評価が困難で 1000 μM 未満で得られた陰性の結果を基に、感作性が陰性とは判定できない。

8. 結論

ARE-Nrf2 Luciferase Test Method は、感作性発現機序における第二段階のイベントであるケラチノサイトにおける炎症反応および Nrf2-Keap1-ARE pathway を利用したレポーターアッセイであり、化学物質の感作性を判断する上で重要な情報を与えてくれる。

マウスを用いる LLNA の 1/7 程度のランニングコストで実施可能であり、*in vitro* 試験法であることから有用性は高い。しかしながら、現時点で本試験法に使用できることが知られている細胞系は KeratinoSensTM のみであり、その使用には細胞系を樹立した Givaudan 社からライセンスを受けることが必要なため、導入の容易な試験系とは言い難い。

本試験法の先行バリデーション研究における施設内再現性は、5 施設中 1 施設において、GHS 区分 1B に分類される物質 (弱い感作性物質) および非感作性物質で再現性が得られなかったため、目安とした達成基準 (85%) に達しておらず、強い感作性物質以外では判定がぶれる懸念がある。一方、施設間再現性は、目安とした達成基準 (80%) を上回ったものの、本評価に使用された皮膚感作性陽性物質の内訳は、GHS で区分 1A に分類される物質が 11 物質に対し、施設内で再現性が得られない場合のある GHS で区分 1B に分類される物質が 4 物質と偏りがあることは留意点と考える。

100 物質以上を評価した二つの報告における本試験法の感度は、76.7% と 77% であり、陰性の結果が得られた場合は、偽陰性の可能性を考慮し、補完し得る他の試験より確認しなければならない。また、特異度も、82.1% と 79% であることから、陽性の結果が得られた場合にも、偽陽性の結果が生じる可能性があることに留意しなければならない。

本試験法では、活性化に代謝系を必要とする化学物質は、正しくその感作性が検出されない可能性がある。また、細胞を用いた評価系であるため、細胞毒性や疎水性の高い物質では規定されている最高濃度 (2000 μM) での評価が難しく、陰性判定が下せない場合があ

る。

以上を踏まえ、本委員会は、本試験法が皮膚感作性評価に汎用されるためには、KeratinoSens™が安価に入手できることが前提と考える。また、本試験法の様々な限界を考慮すると、本試験法単独では皮膚感作性の評価は不十分であり、証拠の重み付けや他の試験法（LLNA、モルモットを用いる皮膚感作性試験など）と組み合わせでの評価を推奨する。

引用文献

- 1) EURL ECVAM (2012) ESAC Working Group Peer Review Consensus Report on Givaudan-coordinated study transferability and reliability of the KeratinoSens assay for skin sensitisation testing
- 2) OECD (2014, in preparation) Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitization ARE-Nrf2 luciferase test methods in TG xxx. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N.XXX, OECD, Paris.
- 3) OECD (2015) *In Vitro* Skin Sensitization: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 442D.
- 4) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™
- 5) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick F. and Kern P. (2013) A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, 33, 1337-1352.
- 6) Natsch A. and Emter R. (2008) Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: application to the *in vitro* testing of the sensitization potential of chemicals. *Toxicological Science*, 102, 110-119.
- 7) Emter R., Ellis G. and Natsch A. (2010) Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 245, 281-290.
- 8) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Norman K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A. and Emter R. (2011) The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicology in Vitro*, 25, 733-744.
- 9) EURL ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitization testing, 42 pp.
http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.