

OECDの化学物質の試験に関するガイドライン

In vitro 皮膚感作性：角化細胞株レポーターアッセイ (ARE-Nrf2 Luciferase Test Method)

はじめに

1. 皮膚感作性物質とは、国連勧告「化学品の分類および表示に関する世界調和システム」(UN GHS) (1)により定義されているとおり、皮膚接触後にアレルギー反応を引き起こす物質のことをいう。本試験ガイドライン (TG) は、UN GHS (1)に従い皮膚感作性物質と非感作性物質を識別するために用いられる *in vitro* 試験 (角化細胞株レポーターアッセイ) について記したものである。
2. 皮膚感作性の原因となる主要な生物学的事象に関しては、広く意見が一致している。皮膚感作性に伴う化学的および生物学的機序に関するこれまでの知識は、有害転帰経路 (AOP) (2)の形式で要約され、分子レベルの初期事象 (molecular initiating event) からその中間事象を通じ健康に対する有害作用 (すなわち、ヒトにおけるアレルギー性接触皮膚炎、またはげっ歯類における接触過敏症) に至るまでを含んでいる(2) (3)。分子レベルの初期事象とは、皮膚内に存在する蛋白質の求核中心と求電子物質との共有結合のことである。本 AOP における 2 つ目の主要な事象は角化細胞に起こり、炎症反応や、抗酸化剤/親電子性物質応答配列 (ARE) 依存性経路など特定の細胞シグナル伝達経路と関連する遺伝子発現などが含まれる。3 つ目の主要な事象は樹状細胞の活性化であり、通常は特異的な細胞表面マーカー、ケモカイン、サイトカインの発現により評価される。4 つ目の主要な事象は T 細胞の増殖であり、これは、マウス局所リンパ節試験において間接的に評価される(4)。
3. 皮膚感作性の評価には、通常、実験動物が使用されてきた。広く知られている Magnusson/Kligman のモルモットを用いるマキシマイゼーション法 (Guinea Pig Maximisation Test : GPMT) およびビューラー法 (Buehler Test : TG 406 (5)) は、皮膚感作性の誘導相と誘発相の双方を評価する。マウスを用いる局所リンパ節試験 (LLNA : TG 429 (4))、ならびにその改変法で放射性同位元素を用いない LLNA : DA (TG 442A (6)) および LLNA : BrdU-ELISA (TG 442B (7)) は、すべて誘導相を評価するものであり、動物福祉と皮膚感作性の誘導相を客観的に測定するという点でモルモット試験より優れていることから、これらの試験も受け入れられている。

© OECD, (2015)

本資料は、個人的な非営利目的であれば、出典を適切に明記するという条件で、経済協力開発機構 (OECD) に事前の承諾を得ることなく自由に使用してよい。本資料を商業的に利用する場合は、必ず OECD の書面による承諾を得なければならない。

4. ごく最近では、化学物質に関する皮膚感作性の有害性を評価する場合、機序に基づく *in chemico* および *in vitro* 試験法が科学的に妥当であると考えられている。ただし、現時点で評価に使用できる動物を用いない各々の試験法は、AOP の一部しか確認できていないことから、現在用いられている動物試験の完全な置換には、試験および評価に関する統合的アプローチ (IATA) の中で、動物を用いない試験法 (*in silico*、*in chemico*、*in vitro*) を組み合わせる必要があると考えられる(2) (3)。
5. 本試験ガイドラインで述べられている試験法 (角化細胞株レポーターアッセイ) は、段落 2 で説明した 2 つ目の主要な事象を取り扱う。皮膚感作性物質は、抗酸化剤応答配列 (ARE) により制御される遺伝子群を誘導することが報告されている(8) (9)。皮膚感作性物質など小分子の求電子物質は、センサー蛋白質である Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) に、例えば、そのシステイン残基の共有結合を修飾することにより作用し、その結果、転写因子 Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) から解離する。その後、解離した Nrf2 は、ARE 依存性遺伝子群 (第 II 相解毒酵素をコードする遺伝子群など) を活性化する(8) (10) (11)。
6. 現在、本試験ガイドラインで取り扱う角化細胞株レポーターアッセイは KeratinoSensTM による試験法のみ存在し、本試験法のバリデーション試験 (9) (12) (13)が終了したのに続き、独立したピアレビュー (第三者評価) (14)が欧州動物実験代替法評価センター (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing : EURL ECVAM) により実施された。KeratinoSensTM による試験法は、有害性の分類および表示を目的に、皮膚感作性物質と非感作性物質を識別するために IATA の一部として用いることが科学的に妥当であると判断された(14)。本試験法を実施を希望する施設は、本試験法の開発企業とライセンス契約を結ぶことで、KeratinoSensTM による試験法に用いる遺伝子組み換え細胞株を入手できる(15)。
7. 用語の定義を補遺 1 に示す。

最初に考慮すべき事項、適用および限界

8. Keap1-Nrf2-ARE 経路の活性化は皮膚感作性の AOP に関する 2 つ目の主要な事象のみ取り扱うため、本経路の活性化に基づく試験法から得られる情報は、それ自体で、化学物質の潜在的皮膚感作性について結論づけるには十分ではない。したがって、今回の試験ガイドラインにより得られたデータは、他の補足情報 (例えば、皮膚感作性の AOP である別の主要な事象に取り組んだ *in vitro* 試験の情報や、類似化学物質からの推定など試験を伴わない情報) と組み合わせ、IATA などの統合的アプローチに照らして検討すべきである。角化細胞株レポーターアッセイと他の情報との併用法に関する例は、文献(13) (16) (17) (18) (19)に報告されている。

9. 本試験ガイドライン記載の試験法を用いることにより、IATA に照らして皮膚感作性物質（すなわち、UN GHS におけるカテゴリー1）と非感作性物質を識別することができる。本 TG を単独で用いて、皮膚感作性物質を当局が UN GHS (1) で定義したサブカテゴリーである 1A および 1B に分類することはできず、安全性評価に際し、皮膚感作性の強さを予測することもできない。しかし、特定の規制の枠組みによっては、陽性結果を単独で用いて、化学物質を UN GHS におけるカテゴリー1 に分類できる場合がある。
10. 本試験法の独立した第三者評価に用いられたバリデーション試験の結果および本試験法の開発施設から得られたデータセットに基づく、KeratinoSens™ による試験法は、細胞培養の経験がある実験室への技術移管が可能であることが確認されている。本試験法の再現性は、同一施設内および複数の施設間でいずれも約 85% である(14)。本試験法の評価および第三者評価用に EURL ECVAM に提出されたすべてのデータによると、LLNA の結果と比較した場合、KeratinoSens™ による皮膚感作性物質（すなわち、UN GHS におけるカテゴリー1）と非感作性物質とを識別する正確度は 77% (155/201)、感度は 78% (71/91)、特異度は 76% (84/110) であった (14)。これらの数値は、本試験法の開発施設が約 145 種類の被験物質の成績に基づき公表した数値と近似している（正確度 77%、感度 79%、特異度 72%）(13)。KeratinoSens™ では、皮膚感作性の強度が低い (low) ～中程度 (moderate) の化学物質（すなわち、UN GHS におけるサブカテゴリー1B）は、皮膚感作性の強度が高い (high) 化学物質（すなわち、UN GHS におけるサブカテゴリー1A）に比べて予測能は低い(13) (14)。総合すると、これら情報は、KeratinoSens™ による試験法は、皮膚感作性の有害性の同定に有用であることを示している。なお、本試験法は、IATA に照らし上記段落 9 の条項に従って、他の情報と組み合わせて検討されるべきであることから、KeratinoSens™ について単独の試験法としてここに示された正確度の値は指標にすぎない。さらに、皮膚感作性の動物を用いない試験法を評価する場合、LLNA およびそれ以外の動物試験の結果は、検討対象の種（すなわち、ヒト）における皮膚感作性を完全に反映しているとはいえないことに留意すべきである。
11. 「被験物質」という用語は、本試験ガイドラインで用いる場合、試験の対象となる物質のことをいい¹、被験物質が単一の物質か混合物であるかは角化細胞株レポーターアッセイへの適用を規定するものではない。現在入手可能なデータによると、KeratinoSens™ による試験法は、各種有機官能基を含む被験物質の評価および反応メカニズム、(in vivo 試験により判定される) 皮膚感作性の強度、物理化学的特性の検討に適用可能であることが示された(9) (12) (13) (14)。主に単一成分物質が評価されているが、データは限定的であるものの混合物の成績も存在する(20)。本試験法は、多成分物質および混合物の試験に技術的には適用可能である。ただし、ある混合物について規制当局への提出を意図にデータを取得する場合、

¹ 2013年6月の合同会議において、可能な場合、新規および更新版の試験ガイドラインでは、試験の対象となる物質を表現する「被験物質」という用語について、より一貫した使用を直ちに行うべきであることが合意された。

本試験ガイドラインを用いる前に、目的に合った適切な結果が示され得るか、また、示される場合その理由について検討する。当該混合物の試験の規制要件がある場合には、こうした検討は不要である。さらに、多成分物質または混合物の試験の場合、認められる反応に細胞毒性成分が影響し得ることを考慮する。本試験法は、水かジメチルスルホキシド (DMSO) のいずれかに可溶であるか安定した分散液 (すなわち、被験物質が沈殿することも、溶媒から分離して異相を示すこともないコロイドまたは懸濁液) となる被験物質 (多成分物質または混合物の試験の場合、被験物質の構成成分のすべてを含む) に適用可能である。最終的に必要とされる最高濃度である 2000 μM (段落 22 参照) において、これらの条件を満たさない被験物質は、それでもなおより低濃度で試験できる。このような場合、段落 39 記載の陽性の基準を満たす結果である場合、被験物質を皮膚感作性物質であると判断できるが、濃度 1000 μM 未満で得られた陰性結果については、結論が得られないと考えるべきである (段落 39 の予測モデル参照)。一般に、LogP が 5 までの被験物質は容易に試験を行えるが、LogP が 7 を超える疎水性の極めて高い物質は本試験法の適用外であることが知られている(14)。LogP が 5 と 7 の間にある被験物質については、限られた情報しかない。

12. リジン残基のみに反応性を有する物質は、本試験法により陰性と検出され得ることから、陰性結果は慎重に解釈する。さらに、本試験法に用いられる細胞株の代謝能が限定的であること(21)、また、本試験法の実験条件からプロハプテン (すなわち、酵素 P450 を介するなど酵素による活性化を要する化学物質)、および特に酸化速度が遅いプレハプテン (すなわち、自動酸化により活性化される化学物質) も陰性結果を示す場合がある。一方、感作物質としての作用はないが、化学的ストレスとして作用する被験物質は、偽陽性結果をもたらすことがある(14)。さらに、細胞毒性が高い被験物質では、常に信頼性の高い評価が得られるわけではない。最後に、ルシフェラーゼ酵素反応を干渉する被験物質は、本試験法のルシフェラーゼ活性に影響を及ぼし、見かけ上阻害か亢進のいずれかをもたらすことがある(22)。例えば、1 μM を超える濃度の植物性エストロゲンの場合、ルシフェラーゼを利用した別のレポーター遺伝子による試験法において、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を過剰に活性化させるため、発光シグナルに干渉することが報告されている(23)。結果として、高濃度の植物性エストロゲン、または植物性エストロゲン様のルシフェラーゼレポーター遺伝子の過剰活性化をもたらすと疑われる類似の化合物の場合、得られたルシフェラーゼの発現については慎重に検討する必要がある(23)。他の特定の категорияに属す被験物質に本試験ガイドラインが適用できない証拠が示され得る場合、本試験法は、そのような categoriaに属す物質に用いるべきではない。
13. 皮膚感作性物質と非感作性物質を識別するのに加え、KeratinoSensTM は、IATA などの統合的アプローチの中で用いられた場合、感作性の強度の評価が可能な場合がある濃度-反応情報も提示する(19)。一方、KeratinoSensTM の成績が、強度の評価(24)、および UN GHS (1)に

従う感作性物質のサブカテゴリー分類に利用するためには、望ましくは信頼性が高いヒトデータに基づいたさらなる作業が求められる。

試験の概要

14. 角化細胞株レポーターアッセイには、選択可能なプラスミドを安定的に導入した HaCaT ヒト角化細胞由来の不死化した接着細胞株を使用する。本細胞株はルシフェラーゼ遺伝子含有し、本遺伝子は、接触感作性物質による発現増加が知られている遺伝子由来の ARE と融合した恒常的プロモーターの転写制御下に置かれている(25) (26)。このルシフェラーゼによるシグナルは、内因性の Nrf2 依存性遺伝子の感作性物質による活性化を反映しており、本遺伝子組み換え細胞株におけるルシフェラーゼのシグナルが Nrf2 に依存していることは確認されている(27)。したがって、求電子性の被験物質に暴露後の細胞において、Nrf2 転写因子活性化の指標として確立されたルシフェラーゼ発光基質を用いて、ルシフェラーゼ遺伝子誘導の（発光検出による）定量的測定が可能となる。
15. KeratinoSens™ において、被験物質が所定の閾値を超える（すなわち、1.5 倍超または 50% 超の上昇）統計的に有意なルシフェラーゼ活性を誘導し、細胞生存率に有意な影響を及ぼさないと定めた濃度を下回る（すなわち、1000 μM 未満かつ細胞生存率が 70% 超となる濃度(9) (12)) 場合、被験物質は陽性と判定される。そのために、溶媒（陰性）対照を上回るルシフェラーゼ活性の最大誘導倍率（maximal fold induction : I_{max} ）を測定する。さらに、複数濃度の被験物質に細胞を暴露することで、ルシフェラーゼ活性の閾値を超える統計的に有意な誘導に必要な濃度（すなわち、 $EC_{1.5}$ 値）について、用量反応曲線から補間する（算出については段落 32 参照）。最後に、ルシフェラーゼ活性を誘導する濃度が細胞毒性に達しない濃度で生じるか評価するため、並行して細胞毒性を測定する。
16. 本試験ガイドラインに従って角化細胞株レポーターアッセイを日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、補遺 2 記載の習熟度評価用の 10 物質を用いて技術的習熟度を立証すること。
17. 性能標準を評価する物質（PS）(28)が示されているため、KeratinoSens™ に類似した新規または改変角化細胞株レポーターアッセイのバリデーションは可能であり、それらを含む形で本試験ガイドラインを適切なタイミングで改定することができる。こうした試験法をレビューし、OECD による本試験ガイドラインに含める場合には、PS に従って評価された試験法のみデータ相互受け入れ制度（Mutual Acceptance of Data : MAD）が保証されることになる。

試験手順

18. 現在、本試験ガイドラインが取り扱う試験法では、KeratinoSens™法のみ科学的に妥当である(9) (12) (13) (14)。KeratinoSens™に関する標準操作手順書 (SOP) は入手可能であり、実施施設において本試験法を実施および使用する場合には採用すべきである(15)。本試験法を導入しようとする施設は、本試験法の開発企業とライセンス契約を結ぶことにより、KeratinoSens™法に用いられる遺伝子組み換え細胞株を入手できる。ARE-Nrf2 ルシフェラーゼ試験法の主要な内容および作業手順について、以下の段落に記す。

角化細胞培養液の調製

19. 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遺伝子導入細胞株を用いる (例えば、KeratinoSens™細胞株)。入手次第、細胞を増殖させ (例えば、2~4 継代)、均一の保存細胞として凍結する。この初代ストック由来の細胞は、最大継代数 (すなわち、KeratinoSens™の場合 25 回) を限度に増殖させることが可能で、適切な維持用培地 (KeratinoSens™の場合、培地は血清および Geneticin 含有 DMEM になる) を用いて日常的に行う試験に使用される。
20. 試験では細胞を 80~90%コンフルエントにし、細胞をフルコンフルエントに増殖させないよう留意する。試験前日に細胞を採取し、96 ウェルプレートに播種 (KeratinoSens™の場合、10,000 cells/well) する。ウェル全体の均一な細胞数の分布を確保するため、播種の間に細胞が沈降しないよう注意を払う。この注意を怠ると、この段階でウェル間に大きなばらつきが生じることがある。測定毎に、3 回の繰り返し測定はルシフェラーゼ活性の測定に用い、並行して行う 1 回の測定は細胞生存率の測定に用いる。

被験物質および対照物質の調製

21. 被験物質および対照物質は、試験当日に調製する。KeratinoSens™法の場合、被験物質をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、最終濃度 (例えば、200 mM) にする。DMSO 溶液は、それ自体滅菌済みであるとみなされるため、滅菌濾過は不要である。DMSO に不溶の被験物質は滅菌水または培養液に溶解し、その溶液を濾過などにより滅菌する。分子量 (MW) が不明の被験物質の場合、KeratinoSens™法では、原液を初期設定濃度 (40 mg/mL または 4% (w/v)) に調製する。DMSO 以外の溶媒、水、または培養液を用いる場合には、十分な科学的根拠を提示する。
22. 被験物質を DMSO に溶解した原液を DMSO を用いて段階希釈し 12 段階の主要濃度のサンプルを得る (KeratinoSens™法の場合、0.098~200 mM)。DMSO に不溶の被験物質では、滅菌水または培養液を用いて上記主要濃度を得る段階希釈を行う。用いる溶媒に関わらず、次に上記主要濃度のサンプルを血清含有培養液でさらに 25 倍希釈し、最終的にはこれがさ

らに4倍に希釈されるため、被験物質の最終濃度は、KeratinoSensTM法の場合0.98~2000 µMの範囲となる。正当な根拠（例えば、細胞毒性を有する場合、または溶解性が低い場合）があれば、別の濃度を用いることができる。

23. KeratinoSensTM法に用いられる陰性（溶媒）対照は、DMSO（CAS番号：67-68-5、純度99%以上）とし、1プレートあたり6ウェル分を調製する。陰性対照では、主要濃度について段落22の記載と同じ希釈を行うため、最終的な陰性（溶媒）対照の濃度は1%になる。この濃度は、細胞生存率に影響を及ぼさないことが知られ、被験物質および陽性対照に含まれるDMSOと同じ濃度に相当する。水で希釈したDMSOに不溶の被験物質の場合、最終的な試験溶液のウェルすべてにおいて、DMSO濃度を他の被験物質および対照物質の場合と同じように1%に調製しなければならない。
24. KeratinoSensTMの場合に用いられる陽性対照はシナナムアルデヒド（CAS番号：14371-10-9、純度98%以上）とし、（6.4 mMの原液から）DMSOで5段階濃度（0.4~6.4 mMの範囲）のサンプルを調製する。また、濃度について段落22記載のとおり希釈するため、最終的な陽性対照の濃度は4~64 µMの範囲となる。これ以外に、ほぼ中央の濃度範囲でEC_{1.5}値を示す適切な陽性対照の場合、背景データがあり、実行許容基準を満たせば、用いることができる。

被験物質および対照物質の適用

25. 被験物質および陽性対照物質毎に、1つの実験において予測（陽性または陰性）結果を求める必要がある。1つの実験は独立して2回以上繰り返し、それぞれ3回の反復測定からなる（すなわち、6回）。独立した2回の繰り返し測定間で結果が一致しない場合、3回の反復測定からなる3回目の繰り返し測定を実施する（すなわち、9回）。独立した繰り返し測定は、新たに調製した被験物質原液および細胞を用いて、別の日に実施する。ただし、細胞は同じ継代数由来でもよい。
26. 段落20記載のとおり、播種してから細胞を96ウェルプレートで24時間増殖させる。次に、培地を除去し新たな培養液（KeratinoSensTMの場合、血清含有、ジェネテシン不含の培養液150 µL）と交換し、これに25倍希釈した被験物質および対照物質50 µLを添加する。背景値を評価するため、少なくとも1プレートあたり1ウェルは空のまま（無細胞かつ無処置）にする。
27. KeratinoSensTM法の場合、次に、処理したプレートを5% CO₂存在下、37±1°Cで約48時間インキュベートする。被験物質のインキュベーションに先立ち、例えば、アルミホイルでプレートを被覆することにより、揮発性の被験物質の蒸発、および被験物質によるウェル間の交差汚染を回避するよう留意する。

ルシフェラーゼ活性の測定

28. 適切な発光測定値を保証するには、次の3つの因子がきわめて重要である。

- 高感度のルミノメーターの選択
- 光の交差による悪影響を回避するため、十分な高さを有するプレートの使用
- 十分な感度およびばらつきの少なさを確保するため、十分な光出力を有するルシフェラーゼ基質の使用

試験に先立ち、補遺 3 記載のとおり品質管理実験を実施し、上記 3 点が満たされていることを確認する。

29. KeratinoSens™ 法の場合、被験物質および対照物質の暴露時間が 48 時間経過後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、発光測定のための細胞溶解用緩衝液を各ウェルに添加し、室温で 20 分間静置する。

30. 次に、細胞溶解物を含むプレートを測定するためにルミノメーターに静置し、KeratinoSens™ 法の場合、次のとおり実行する。(i) 各ウェルにルシフェラーゼ基質を添加する(すなわち、50 µL)。(ii) 1 秒間待つ。(iii) 2 秒間のルシフェラーゼ活性を積算する。例えば、用いるルミノメーターの機種にもよるが、別の設定を用いる場合には、その正当性を証明すること。さらに、補遺 3 の品質管理実験が十分に満たされる場合、グロータイプの基質を用いることもできる。

細胞毒性の評価

31. KeratinoSens™ による細胞生存率の測定では、暴露時間が 48 時間経過後、培地を MTT (3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド、別名チアゾリルブルーテトラゾリウムブロミド、CAS 番号: 298-93-1) を含有する新たな培地に交換し、細胞を 5% CO₂ 存在下、37°C で 4 時間インキュベートする。次に、この MTT 培地を除去し、細胞を一晩静置し(例えば、10% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液を各ウェルに添加することにより) 溶解する。振盪後、光度計により 600 nm における吸光度を測定する。

データおよび報告

データの評価

32. KeratinoSens™ 法の場合、以下のパラメータを算出する。

- 被験物質および陽性対照の任意の濃度において認められた、ルシフェラーゼ活性の最大誘導倍率の平均値 (I_{\max})
- ルシフェラーゼ活性の誘導倍率が、閾値である 1.5 倍（すなわち、ルシフェラーゼ活性の 50% 上昇）を超える濃度である $EC_{1.5}$ 値
- 細胞生存率が 50% 減および 30% 減となる濃度である IC_{50} および IC_{30} 値

ルシフェラーゼ活性の誘導倍率は式 1 により算出し、全体の最大誘導倍率 (I_{\max}) は、個々の繰り返し測定の平均値として算出する。

$$\text{式 1: } \quad \text{誘導倍率} = \frac{(L_{\text{sample}} - L_{\text{blank}})}{(L_{\text{solvent}} - L_{\text{blank}})}$$

ここで

L_{sample} は、被験物質のウェルにおける発光測定値

L_{blank} は、無細胞、無処置からなる空のウェルにおける発光測定値

L_{solvent} は、細胞および溶媒（陰性）対照からなるウェルにおける発光測定値の平均値

$EC_{1.5}$ は式 2 に従って線形補間により算出し、全体の $EC_{1.5}$ は、個々の繰り返し測定の幾何平均値として算出する。

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

ここで

C_a は、誘導倍率が 1.5 超となる最低濃度 (μM)

C_b は、誘導倍率が 1.5 未満となる最高濃度 (μM)

I_a は、誘導倍率が 1.5 超となる最低濃度において測定された誘導倍率（ウェルにおける 3 回の反復測定の平均値）

I_b は、誘導倍率が 1.5 未満となる最高濃度における誘導倍率（ウェルにおける 3 回の反復測定の平均値）

細胞生存率は式 3 により算出する。

$$\text{式 3: } \quad \text{細胞生存率} = \frac{(V_{\text{sample}} - V_{\text{blank}})}{(V_{\text{solvent}} - V_{\text{blank}})} \times 100$$

ここで

V_{sample} は、被験物質のウェルにおける MTT 吸光度の測定値

V_{blank} は、無細胞、無処置からなる空のウェルにおける MTT 吸光度の測定値

V_{solvent} は、細胞および溶媒（陰性）対照からなるウェルにおける MTT 吸光度測定値の平均値

IC_{50} および IC_{30} は式 4 に従って線形補間により算出し、全体の IC_{50} および IC_{30} は、個々の繰り返し測定の幾何平均値として算出する。

$$\text{式 4: } IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100-x)-V_a}{V_b-V_a} \right) + C_a$$

ここで

- x は、 算出濃度における減少率 (IC_{50} では 50、 IC_{30} では 30)
- C_a は、 細胞生存率が $x\%$ 減超となる最低濃度 (μM)
- C_b は、 細胞生存率が $x\%$ 減未満となる最高濃度 (μM)
- V_a は、 細胞生存率が $x\%$ 減超となる最低濃度における細胞生存率
- V_b は、 細胞生存率が $x\%$ 減未満となる最高濃度における細胞生存率

ルシフェラーゼ活性の誘導倍率が 1.5 倍超を示す各濃度について、統計的有意性を（例えば、スチューデントの両側 t 検定により）算出し、3 回の反復サンプルにおける発光測定値と溶媒（陰性）対照のウェルにおける発光測定値とを比較し、ルシフェラーゼ活性の誘導が統計的に有意 ($p < 0.05$) であるか判定する。ルシフェラーゼ活性の誘導倍率が 1.5 倍超となる最低濃度は、 $EC_{1.5}$ 値を判定する値である。各例において、この値が IC_{30} 値未満、すなわち $EC_{1.5}$ の判定濃度において、細胞生存率が 30% 減未満であることを示しているか確認する。

33. データは、グラフで視覚的に確認することが推奨される。明確な用量反応曲線が認められない場合、または得られた用量反応曲線が二相性（すなわち、閾値 1.5 に 2 回交差）である場合、実験を繰り返し、これが被験物質特異的な結果なのか、実験の人為的なことに起因するのか検証する。二相性の反応が、独立した実験において再現可能である場合、より低い $EC_{1.5}$ 値（閾値 1.5 に最初に交差する場合の濃度）を報告する。
34. 統計的に有意でない 1.5 倍超となる誘導が認められた後、より高濃度において統計的に有意な誘導が認められる稀な例の場合、この繰り返し測定の結果は、閾値 1.5 超となる統計的に有意な誘導が、細胞毒性を示さない濃度で得られた場合に限り、妥当かつ陽性であるとみなす。
35. 最後に、被験物質が試験の最低濃度である $0.98 \mu\text{M}$ において、既に 1.5 倍以上の誘導を生じている場合、 $EC_{1.5}$ 値には、用量反応曲線の目視検査に基づき 0.98 未満を設定する。

許容基準

36. KeratinoSensTM 法を用いる場合、次の許容基準を満たすこと。第 1 に、陽性対照であるシナムアルデヒドにより得られるルシフェラーゼ活性の誘導は、試験濃度（4~64 μM ）の少なくとも 1 濃度において閾値 1.5 超となり、（例えば、 t 検定を用いた場合）統計的に有意であること。
37. 第 2 に、シナムアルデヒドの $EC_{1.5}$ 値は、（例えば、バリデーション済みデータセットに基づいた 7~30 μM の間で）実施施設が有する定期的に更新された背景データの平均値の標

準偏差の2倍以内であること。さらに、シナムアルデヒド 64 μM における3回の反復測定について、その誘導の平均値は2~8であること。後者の基準が満たされない場合、シナムアルデヒドの用量反応を慎重に確認すべきであり、シナムアルデヒドの濃度増加に伴い、ルシフェラーゼ活性の誘導の上昇がみられるという明確な用量反応が認められる場合に限り、試験結果を受け入れることができる。

38. 最後に、陰性（溶媒）対照である DMSO の発光測定値について、その変動係数の平均値は、3回反復により検討される6ウェルからなる反復測定毎に20%未満であること。変動係数がこれより高い場合、結果は無効とする。

結果の解釈および予測モデル

39. KeratinoSensTMによる予測では、2回の反復測定の2回、またはこれと同じ3回の反復測定の2回において、以下4つの条件をすべて満たす場合に陽性とみなし、それ以外の場合、KeratinoSensTMによる予測では陰性とみなす（図1）。

1. I_{max} が1.5倍超となり、溶媒（陰性）対照との比較では、（対応のないスチューデントの両側t検定により測定される場合）統計的有意差が認められること。
2. ルシフェラーゼ活性の誘導倍率が1.5超となる最低濃度（すなわち、 $\text{EC}_{1.5}$ の判定濃度）において、細胞生存率は70%超であること。
3. $\text{EC}_{1.5}$ 値が1000 μM 未満（または分子量不明の被験物質の場合200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満）であること。
4. ルシフェラーゼの誘導に明らかに全体的な用量反応（または、段落33で述べた二相性の反応）が認められること。

所定の反復測定において、最初の3つの条件をすべて満たしたが、ルシフェラーゼの誘導に明確な用量反応を認めることができない場合、この繰り返し測定の結果については結論が得られないとみなすべきであり、さらなる測定が必要と考える（図1）。さらに、濃度1000 μM 未満（または分子量不明の被験物質の場合200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満）で得られた陰性結果も、結論が得られないとみなす（段落11参照）。

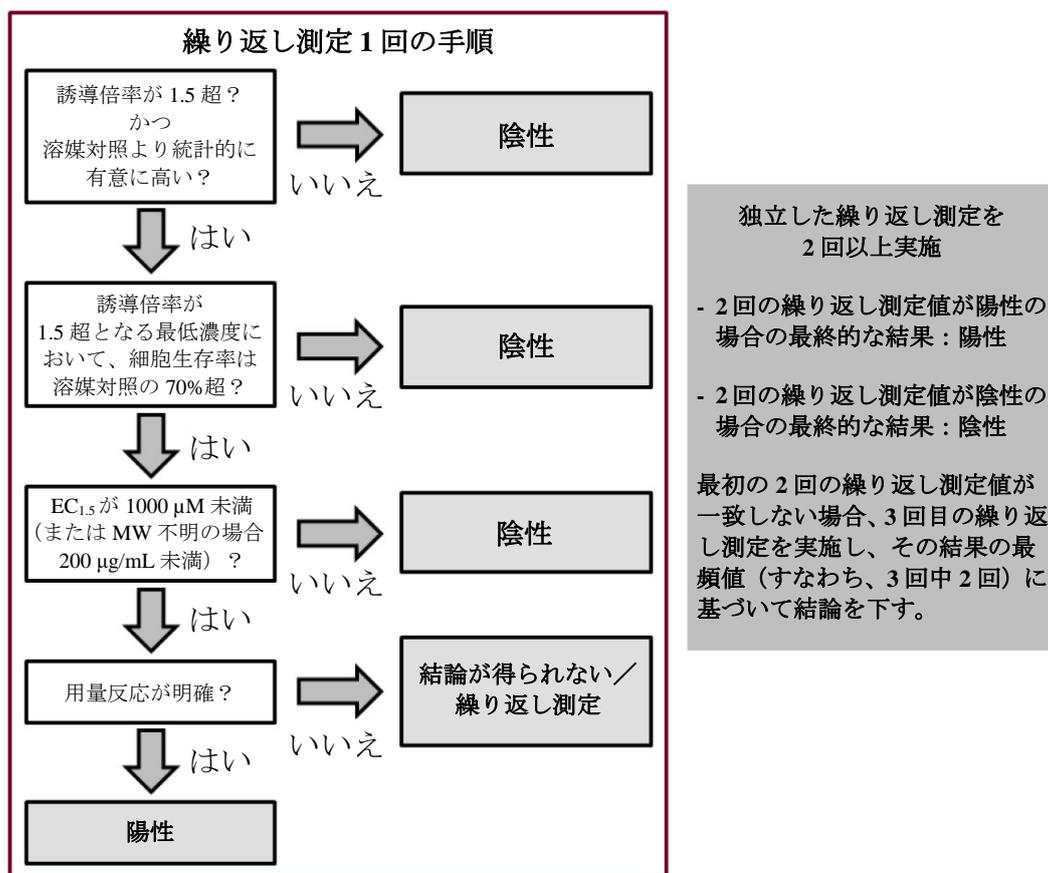


図 1：KeratinSens™ 法に用いられる予測モデル。KeratinSens™ による予測は、IATA の枠組みの中で、また、段落 9 および 11 の条項に従って検討すること。

40. 稀な例として、細胞毒性を示す濃度にきわめて近い濃度でルシフェラーゼ活性を誘導する被験物質については、ある測定では、細胞毒性を示さない濃度（すなわち、 $EC_{1.5}$ の判定濃度が IC_{30} 未満）で陽性になる一方、別の測定では、細胞毒性を示す濃度（すなわち、 $EC_{1.5}$ の判定濃度が IC_{30} 超）でしか活性が得られないことがある。こうした被験物質は、より小さな希釈係数（例えば、ウェル間で 1.33 倍または $\sqrt{2}$ (1.41) 倍に希釈) を用いて、より狭い範囲の用量反応を再検討し、誘導が細胞毒性を示す濃度で生じたのか否か判定する (9)。

試験報告書

41. 試験報告書には以下の情報を含む。

被験物質

- 単一成分物質

- 化学的識別情報、例えば IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式やそれ以外の識別に有用な情報
 - 外観、水溶性、DMSO の溶解性、分子量、および入手可能な範囲のその他の関連する物理化学的性質
 - 純度、適切なデータが可能であれば不純物の化学的同定など
 - 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉碎）
 - 試験濃度
 - 入手可能な範囲の保存条件および安定性
- － 多成分物質、UVCB 物質、混合物：
- 入手可能な範囲の成分の化学的同定（上記参照）、純度、含有量および関連のある物理化学的性質（上記参照）などによるできる限りの特徴付け
 - 外観、水溶性、DMSO の溶解性、および入手可能な範囲のその他の関連する物理化学的性質
 - 既知組成の混合物／ポリマーの場合、分子量もしくは見かけ上の分子量、または試験実施に関連するそれ以外の情報
 - 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉碎）
 - 試験濃度
 - 入手可能な範囲の保存条件および安定性

対照物質

- － 陽性対照
- 化学的識別情報、例えば IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式やそれ以外の識別に有用な情報
 - 外観、水溶性、DMSO の溶解性、分子量、および入手可能な範囲のその他の関連する物理化学的性質
 - 純度、適切なデータが入手可能であれば不純物の化学的同定など
 - 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉碎）
 - 試験濃度
 - 入手可能な範囲の保存条件および安定性
 - 入手可能な場合、適切な実行許容基準であることを示した既存陽性対照結果のヒストリカルデータ
- － 陰性（媒体）対照

- 化学的識別情報、例えば IUPAC または CAS 名、CAS 番号やそれ以外の識別に有用な情報
- 純度、適切なデータが入手可能であれば不純物の化学的同定など
- 本試験ガイドライン記載以外の別の陰性対照／媒体を用いる場合、外観、分子量、および入手可能な範囲のその他の関連する物理化学的性質
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性
- 各被験物質についての溶媒選択の妥当性

試験法の条件

- 試験依頼者名、試験施設名、試験責任者名および住所
- 試験法の説明
- 細胞株、その保存条件および供給元（例えば、細胞株を入手した施設）
- 試験に用いた細胞の継代数およびコンフルエントの状態
- 試験前の播種に用いた細胞の計数法、および均一な細胞数の分布を確保するため行われた措置（段落 20 参照）
- ルミノメーター（例えば、機種）および機器の設定内容、ルシフェラーゼ基質、ならびに補遺 3 記載の品質管理試験により適切な発光測定であることの立証
- 本試験法実施の際に（例えば、習熟度評価用の物質の試験により）実施施設の習熟度を立証、または試験法の経時的な再現性の性能を立証するのに用いた手順

試験手順

- 繰り返し測定数および反復測定数
- 被験物質の濃度、適用手順、暴露時間（推奨事項と異なる場合）
- 評価および測定基準の記述
- 試験許容基準の記述
- 試験手順の修正があればその記述

結果

- 繰り返し測定ごとに被験物質および陽性対照について得られた I_{\max} 値、 $EC_{1.5}$ 値、細胞生存率の値（すなわち、 IC_{50} 、 IC_{30} ）、個々の繰り返し測定すべてのデータを用いて算出された平均値（ I_{\max} 値：平均値、 $EC_{1.5}$ 値および細胞生存率の値：幾何平均値）および標準偏差（SD）の一覧表、ならびに予測モデルに従って得られた被験物質の評価の提示
- 実験ごとに陰性対照の発光測定値により得られた変動係数
- ルシフェラーゼ活性の誘導および細胞生存率の用量反応曲線を描いたグラフ
- 該当する場合、それ以外に関連する知見があればその記述

結果の考察

- KeratinoSensTM法を用いて得られた結果の考察
- 他の関連情報が入手可能な場合、IATA の範囲内における KeratinoSensTM法の結果の考察

結論

参考文献

1. United nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].
2. OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.
3. Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleijnans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology* 85, 367-485.
4. OECD (2010). Skin sensitization: Local Lymph Node assay. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 429. OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
5. OECD (1992). Skin Sensitisation. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 406. OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
6. OECD (2010). Skin sensitization: Local Lymph Node assay: DA. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442A. OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
7. OECD (2010). Skin sensitization: Local Lymph Node assay: BrdU-ELISA. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442B. OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
8. Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicological Sciences* 113, 284-292.
9. Emter R., Ellis G., 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.
10. Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem Res Toxicol.* 18, 1779-1791.
11. Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 18,1, 45-49.
12. Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., 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. *Toxicol. In Vitro* 25, 733-744.

13. Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, 33, 1337-1352.
14. EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSensTM assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.
15. DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSensTM, 17pp. Available: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
16. Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different in vitro and in silico assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol Sci.* 107, 106-121.
17. Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kollé S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and in vitro methods in a weight-of-evidence approach. *Regul Toxicol Pharmacol.* 60, 389-400.
18. Bauch C., Kollé S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.
19. Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A., 2013. Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J Appl Toxicol.* 33, 1353-1364.
20. Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSensTM assay to evaluate plant extracts: A pilot study. *Toxicology In Vitro* 27, 1220-1225.
21. Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kollé S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. *Arch Toxicol* 87, 1683-1969.
22. Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry and Biology* 17, 646-657.
23. OECD (2012). BGI₁Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
24. ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
25. Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J Invest Dermatol*, 126, 1813-1822.

26. Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I. And Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, 301-316.
27. Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol In Vitro* 27, 2225-2232.
28. OECD (2014, in preparation). Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods in TG xxx. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N.XXX, OECD, Paris.
29. OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.
30. NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides – (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. Disponible à l'adresse suivante :
<http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf>

補遺 1

定義

正確度：試験法による結果が、一般的に認められた参照値にどの程度一致するかを示す近似性の指標。試験法の性能の尺度であり、「妥当性」の一側面である。この用語は、多くの場合、試験法の正確な結果の割合を意味する「一致性」の代わりに用いられる(29)。

AOP (有害転帰経路)：分子レベルの初期事象から検討対象の *in vivo* 転帰まで、標的化学物質または一群の類似化学物質の化学構造から生じる一連の事象(2)。

ARE：抗酸化剤応答配列（親電子性物質応答配列（EpRE）とも呼ばれる）は、多くの細胞保護遺伝子および第 II 相酵素の遺伝子上流にあるプロモーター領域に認められる応答配列である。Nrf2 により活性化されると、ARE はこれらの遺伝子の転写誘導に介在する。

変動係数：一群の反復データについて、その標準偏差を平均値で割ることにより算出されるばらつきの尺度。100 を乗じて百分率として表すことができる。

EC_{1.5}：補間により求めた、ルシフェラーゼの誘導倍率が 1.5 倍となる濃度。

IC₃₀：細胞生存率の 30% 減をもたらす濃度。

IC₅₀：細胞生存率の 50% 減をもたらす濃度。

有害性：生物、生物系、または（その下位に属す）生物集団がある物質に暴露された場合、悪影響を引き起こす可能性がある物質固有の性質または状況のこと。

IATA (試験および評価に関する統合的アプローチ)：ある化学物質または一群の化学物質の危険有害性の同定（可能性）、危険有害性の特徴付け（効力）、および／または安全性評価（可能性／効力および暴露）に用いられる体系的アプローチ。本アプローチでは、関連性があるデータをすべて戦略的に統合し重み付けを行うことにより、危険有害性の可能性、および／またはリスク、および／またはさらなる標的の必要性について規制上の意思決定情報を与えるため、試験の実施は最小化される。

I_{max}：溶媒（陰性）対照との比較により得られる、被験物質の任意の濃度において測定されるルシフェラーゼ活性の最大誘導倍率。

Keap1 : Kelch 様 ECH 結合蛋白質 1 は、Nrf2 活性を制御可能なセンサー蛋白質である。非誘導条件下において、センサー蛋白質 Keap1 は転写因子 Nrf2 を標的にし、Nrf2 のユビキチン化およびプロテアソームによる Nrf2 分解を行う。Keap1 の反応性システイン残基の共有結合が小分子により修飾されると、Keap1 から Nrf2 の解離を導ける(8) (10) (11)。

混合物 : 互いに反応しない 2 つ以上の物質からなる混合物または溶液(1)。

単一成分物質 : その定量的組成に、1 主要成分が 80% (w/w) 以上存在することにより定義される物質。

多成分物質 : その定量的組成に、2 つ以上の主要成分が濃度 10% (w/w) 以上 80% (w/w) 未満存在することにより定義される物質。多成分物質は製造過程の結果得られる。混合物と多成分物質との違いは、混合物の場合、2 つ以上の物質が化学反応を起こさず混合することにより得られるのに対し、多成分物質は化学反応の結果得られることにある。

Nrf2 : 核因子 (赤血球由来 2) 様 2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) は、抗酸化剤応答経路に参与する転写因子である。Nrf2 がユビキチン化されないと、Nrf2 は細胞質に集積して核内に移行し、核内で多くの細胞保護遺伝子の 5' 上流にあるプロモーター領域の ARE と結合し転写を開始する(8) (10) (11)。

陽性対照 : 試験系のすべての構成成分を含み、陽性反応を誘導することが知られている物質で処理を反復する対照。陽性対照反応の経時的変化を評価できるように、陽性反応の大きさが過剰であってはならない。

妥当性 : 試験と検討対象の影響との関係と、試験が特定の目的にとって意義や有用性があるかを示す用語。試験が試験対象となる生物学的影響を正確に測定または予測できる程度を示す。妥当性には、試験法の正確性 (一致度) への考慮が盛り込まれる(29)。

信頼性 : 同じプロトコールを用いて試験法を実施したときに得られる経時的な実験室内および実験室間再現性の程度を表す尺度。実験室内および実験室間再現性ならびに実験室内の繰り返し精度の算出により評価される(29)。

再現性 : 同じ試験プロトコールを用いた、同じ物質の試験から得られる結果間の一致 (信頼性の項参照) (29)。

感度 : すべての陽性や活性のある化学物質のうち、試験法によって正確に分類されるものの割合。断定的な結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で考慮することが重要である(29)。

溶媒／媒体対照：被験物質は除いているが、用いる溶媒を含んだ試験系のすべての構成成分からなり反復する対照。同じ溶媒に溶解した被験物質で処理したサンプルについて、ベースラインの反応を確立するため用いられる。

特異度：すべての陰性や不活性な化学物質のうち、試験法によって正確に分類されるものの割合。断定的な結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で考慮することが重要である(29)。

物質：自然の状態の、または製造過程で得られる化学元素とその化合物のことをいい、その製品の安定性を保つために必要な添加物や、その使用工程から派生する不純物は含まれるが、その物質の安定性に影響を及ぼすことも、その組成を変化させることもなく分離する可能性のある溶媒は除く(1)。

被験物質：「被験物質」という用語は、試験対象であることをいう場合に用いる。

国連勧告「化学品の分類および表示に関する世界調和システム」(UN GHS)：人々（雇用主、労働者、輸送担当者、消費者、緊急時対応者など）および環境を守るために、危険有害作用に関する情報を伝達することを目的として、物理学上、健康上および環境上の危険有害性の種類およびレベルの基準に従って化学品（物質および混合物）の分類法を提案するとともに、絵表示・注意喚起語・危険有害性情報・注意書き・化学物質安全性データシートなどの対応する伝達要素を取り扱うシステムである(1)。

UVCB 物質：組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生体物質。

妥当な試験法：特定の目的に対し十分な妥当性および信頼性があるとみなされ、科学的に健全な原則に基づいている試験法。ある試験法が絶対的な意味で妥当というのではなく、定義された目的との関連においてのみ妥当であることをいう(29)。

補遺 2

習熟度評価用の物質

In vitro 皮膚感作性：ARE-Nrf2 ルシフェラーゼ試験法

本試験ガイドラインに従って試験法を日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、表 1 推奨の習熟度評価用の 10 物質について、KeratiSens™により期待される予測結果を正確に入手し、習熟度評価用の 10 物質中 8 物質以上について、それぞれの基準範囲内に含まれる EC_{1.5} 値および IC₅₀ 値を入手することにより技術的習熟度を立証すること。習熟度評価用のこれらの物質は、皮膚感作の危険有害性について得られる反応の範囲を示すため選択された。それ以外の選択基準は、市販品であること、高品質の *in vivo* 参照データが入手可能であること、および KeratiSens™による試験法から高品質の *in vitro* データが入手可能であることとした。

表 1：KeratiSens™による試験法の技術的習熟度の立証に推奨される物質

習熟度評価用の物質	CAS 番号	物理的 状態	<i>In vivo</i> における 予測 (1)	KeratiSens™ による予測 (2)	EC _{1.5} (μM) の基準範囲 (3)	IC ₅₀ (μM) の基準 範囲(3)
イソプロパノール	67-63-0	液体	非感作物質	陰性	> 1000	> 1000
サリチル酸	69-72-7	固体	非感作物質	陰性	> 1000	> 1000
乳酸	50-21-5	液体	非感作物質	陰性	> 1000	> 1000
グリセロール	56-81-5	液体	非感作物質	陰性	> 1000	> 1000
シンナミルアルコール	104-54-1	固体	感作物質 (弱い [weak])	陽性	25 - 175	> 1000
ジメタクリル酸 エチレングリコール	97-90-5	液体	感作物質 (弱い [weak])	陽性	5 - 125	> 500
2-メルカプト ベンゾチアゾール	149-30-4	固体	感作物質 (中程度 [moderate])	陽性	25 - 250	> 500
メチルジプロモ グルタロニトリル	35691-65-7	固体	感作物質 (強い [strong])	陽性	< 20	20 - 100
4- (メチルアミノ) フェノール硫酸塩	55-55-0	固体	感作物質 (強い [strong])	陽性	< 12.5	20 - 200
2,4-ジニトロクロロ ベンゼン	97-00-7	固体	感作物質 (非常に強い [extreme])	陽性	< 12.5	5 - 20

- (1) *In vivo* における危険有害性（および強度）の予測結果は、LLNA データ(13)に基づく。*In vivo* における強度は、欧州化学物質生態毒性および毒性センター（ECETOC）(24)により提唱された基準を用いて得られている。
- (2) KeratiSens™による予測は、IATA の枠組みの中で、また、本試験ガイドラインの段落 9 および 11 の条項に従って検討すること。
- (3) 既存の測定値(12)に基づく。

補遺 3

発光測定値の品質管理

KeratinoSens™法において最適な発光測定値を確保するための基本的な実験

ルミノメーターにより信頼性の高い結果を得るには、次の3つのパラメータが極めて重要である。

- 対照ウェルにおいて安定したバックグラウンドをもたらす十分な感度
- 長時間の測定により特定のプレート上で階調の変化を生じないこと
- 強い活性のウェルに隣接するウェルにおいて光の混入を生じないこと

試験に先立ち、以下記載のとおり対照プレートの設定を検討することにより、適切な発光測定値を確保することが推奨される（3回の反復試験）。

最初の訓練実験におけるプレートの設定

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	EGDMA 0.98	EGDMA 1.95	EGDMA 3.9	EGDMA 7.8	EGDMA 15.6	EGDMA 31.25	EGDMA 62.5	EGDMA 125	EGDMA 250	EGDMA 500	EGDMA 1000	EGDMA 2000
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	CA 4	CA 8	CA 16	CA 32	CA 64	空

EGDMA：ジメタクリル酸エチレングリコール（CAS 番号：97-90-5）、強い誘導を示す化学物質

CA：シナナムアルデヒド（CAS 番号：104-55-2）、陽性対照

品質管理解析により、以下の項目を立証すること。

- 行 D に明確な用量反応が認められ、 I_{max} がバックグラウンドの 20 倍超である（ほとんどの場合、 I_{max} 値は 100~300 に達する）
- 行 C および E に用量反応を認めない（特に EGDMA の行にある、強い活性のウェルに隣接して生じる光の混入の可能性により、誘導倍率の値が 1.5 を超えない（理想的には 1.3 を超えない））。
- 行 A、B、C、E、F、G 間に統計的有意差を認めない（すなわち、プレート上の階調の変化を認めない）
- 行 A、B、C、E、F、G および行 H の DMSO 添加ウェルのいずれも、ばらつきが 20% 未満であること（すなわち、安定したバックグラウンド）