



第4項  
健康への影響

## 試験ガイドライン No. 442D In Vitro 皮膚感作性

角化細胞活性化における **AOP** の  
キーイベントを対照としたアッセイ

2024 年 6 月 25 日

経済協力開発機構（OECD）の化学物質  
の試験に関するガイドライン



## 化学物質の試験に関する OECD ガイドライン

### AOP のキーイベント（角化細胞活性化）に基づく *in vitro* 皮膚感作性アッセイ

#### 概要

#### キーイベント（角化細胞活性化）に基づく試験ガイドライン

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通り、皮膚との反復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。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最新の知識は、**Adverse Outcome Pathway**（有害転帰経路（AOP））として要約されており（2）、分子レベルの初期事象からその中間事象を通じて有害作用、すなわち、アレルギー性接触皮膚炎に至るまでが含まれている。この AOP では、有機化学物質など、チオール（すなわちシステイン）および第一級アミン（すなわちリジン）と反応する化学物質に焦点が絞られている。この場合、分子レベルの初期事象（すなわち、第一のキーイベント）とは、皮膚内に存在するタンパク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 における第二のキーイベントは角化細胞に起こり、炎症反応や、抗酸化剤／求電子剤応答配列（**antioxidant/electrophile response element : 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の変化などが含まれる。第三のキーイベント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。第四のキーイベントは T 細胞の増殖である。
2. 本試験ガイドラインでは、皮膚感作性に関する AOP の第二のキーイベント、すなわち、角化細胞活性化について記載された機序を対象とした *in vitro* 試験について規定する（2）。本試験ガイドラインは、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試験法からなる。現在、本試験ガイドラインに記載されている試験法は、2 種類の *in vitro* ARE-Nrf2 ルシフェラーゼ試験方法と、遺伝子発現定量に基づく試験方法が含まれる：
  - 角化細胞株レポーターアッセイ KeratinoSens™ 試験法（付録 IA）、
  - 角化細胞株レポーターアッセイ LuSens 試験法（付録 IB）および
  - 表皮感作試験 — EpiSensA（付録 IC）。
3. これら 3 種類の試験法は科学的に妥当であると考えられている。KeratinoSens™ 試験法はまずバリデーション試験を受け、次に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）の科学諮問委員会（ECVAM Scientific Advisory Committee : ESAC）による独立したピアレビュー、および EURL ECVAM による承認勧告を受けており、角化細胞株レポーターアッセイに関して検証済み標準試験法（**validated reference method : VRM**）とみなされている（3）（4）（5）（6）。その後、LuSens 試験法について性能標準に基づくバリデーション研究が行われ、それに基づいてこの試験法についても ESAC による評価および承認勧告がなされた（7）（8）

(9) (10)。EpiSensA は、日本代替法評価センター（JaCVAM）による検証研究（11）と独立したピアレビュー（12）を経て評価された。この試験法は、再構築ヒト表皮（RhE）モデルにおいて、逆転写定量 PCR を用いて、角化細胞活性化に関連するマーカー遺伝子（*ATF3*、*IL-8*、*GCLM*、および *DNAJB4*）の発現変化を定量する試験法に関して、本物質は VRM とみなされる。この種の試験法についても、同様のおよび RhE ベースの試験法の検証および評価を容易にするため、性能基準（13）が利用可能である。

## キーイベントに基づく試験ガイドラインに含まれる試験方法の背景および原理

4. 皮膚感作性の評価には、歴史的に実験動物が使用されてきた。広く知られている Magnusson と Kligman のモルモットを用いるモルモット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）（OECD TG 406）（14）は、皮膚感作性の誘導相と惹起相の双方を評価する。マウスを用いる局所リンパ節試験（Local Lymph Node Assay : LLNA）（OECD TG 429）（15）、ならびにその改変法で放射性同位元素を用いない LLNA : DA（OECD TG 442A）（16）、LLNA : BrdU-ELISA および BrdU-FCM（OECD TG 442B）（17）の 3 法のマウス試験は、すべて誘導相のみを評価するものであり、動物福祉および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。
5. 化学物質に関する皮膚感作性の有害性を評価するため、皮膚感作性の AOP の最初の 3 つのキーイベントを対象とした発症機序に基づく *in chemico* および *in vitro* 試験法が採択された。OECD TG 442C では、第一のキーイベントを対象とするペプチド結合性試験（18）を記載している。現行の試験ガイドラインでは、第二のキーイベントである角化細胞の活性化の評価が行われ、OECD TG 442E では、皮膚感作性の AOP の第三のキーイベントである樹状細胞の活性化が対象となっている（16）。最後に、第四のキーイベントは T 細胞の増殖であり、これは LLNA において間接的に評価される（15）。皮膚感作性の分類を決定するために、すべての主要な事象を評価する必要があるわけではないことに留意すべきである。
6. 角化細胞の活性化は皮膚感作性の AOP のキーイベントの 1 つを表すにすぎないことから（20）、この特異的なキーイベントに対して開発された試験法により得られる情報は、化学物質の皮膚感作性の有無について結論を出す目的としては十分とはいえない。したがって、本試験ガイドラインに記載された試験法により得られるデータは、試験および評価に関する統合的アプローチ（Integrated Approaches to Testing and Assessment : IATA）の範囲内で用いた場合、皮膚感作性の AOP である別のキーイベントを対象とした *in vitro* 試験、および類似化学物質からの類推などの非実験的手法によって得られる他の関連補足情報とともに、皮膚感作性物質（すなわち、UN GHS 区分 1）と非感作性物質を識別するために提示されるものである（20）。確定方式（Defined Approach）、すなわち、利用する情報源一式に対して、また予測に用いる手順において標準化された手法の範囲内で、これらの試験法を用いて得られたデータの活用例が報告されており（20）、皮膚感作性に関する OECD 試験ガイドライン（TG）の定義されたアプローチに実装されている。皮膚感作性に関する確定方式においてこれらの手法から得られたデータを使用する場合、境界線基準の適用またはその他のデータ解釈手順については試験ガイドライン 497 を参照すること（21）。境界線基準の適用に関する詳細は、付録 IA の図 1 を参照のこと。
7. 本試験ガイドラインに記載されている試験法は、単独では、UN GHS（1）に規定された細区分である 1A および 1B に当局が皮膚感作性物質を分類することも、安全性評価に際して皮膚感作性の強さを予測

することもできない。しかし、規制の枠組みによっては、これらの試験法から得られた陽性結果を単独で用いて、化学物質を UN GHS の区分 1 に分類できる場合がある。

8. 本試験ガイドラインに含まれる試験方法は、手順、適用範囲、制限事項において差異がある可能性があるが、相互データ受容の恩恵を受けつつ、皮膚感作性に関する AOP のキーイベントである角化細胞活性化に関する試験結果に対する各国の要求事項に対応するためにそれぞれ使用できる。確定方式 (DA) の文脈では、試験方法は自動的に相互に代替可能とは限らない。TG497 では、どの方法/方法の組み合わせを使用すべきかが規定されている。

9. 本試験ガイドラインにおける「被験物質」という用語は、試験の対象となる物質のことであり<sup>1</sup>、単一成分物質、多成分物質、および／または混合物の試験に対する試験法の適用可能性とは無関係である。液内培養において試験を行う場合、被験物質は曝露用培地に溶解するか、または少なくとも安定な分散液を形成することを判断しなければならない（例：最大の最終試験濃度にて被験物質が曝露用培地に溶解／分散していることを目視で点検し、未溶解の残渣がないこと、また、溶液が数時間静置されていた場合は沈殿や相分離が起こっていないことを確認する）。

10. 多成分物質／混合物に対する試験法の適用可能性については、現在入手可能な情報が限られている (22) (23) (24)。バリデーション試験における評価はなされていなくても、試験法は多成分物質および混合物の試験にも技術的に適用可能である場合がある。混合物、試験の実施が困難である化学物質（不安定な物質など）、または本ガイドラインに記載されている適用領域の範囲内にあることが明確ではない化学物質の試験にあたっては、実施する試験から科学的に意義のある結果が得られるか否かを前もって検討すること。さらに、多成分物質または混合物を試験する場合は、細胞毒性成分が観察対象の反応に干渉する可能性について検討する必要がある（例：高濃度の非感作性の細胞毒性成分が存在することは、低濃度で存在する弱感作性成分や感作性成分による反応をマスクする可能性がある）。特定の場合では、複雑な混合物の感作性について結論を下すために、混合物の主要な画分または複数の画分を構成する単一の主要成分それぞれについて試験を行うことが科学的に正当とされる場合がある。

<sup>1</sup> 2013 年 6 月の合同会議において、可能な場合、新規および改訂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行うべきであることが合意された。

---

<sup>1</sup> 2013 年 6 月の合同会議において、可能な場合、新規および改訂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行うべきであることが合意された。



## 参考文献

- 1) United Nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [[https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev07/07files\\_e0.html](https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html)]
- 2) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ 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](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation)].
- 7) Ramirez T., Mehling A., Kolle S.N., Wruck C.J., Teubner W., Eltze T., Aumann A., Urbisch D., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2014). LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. *Toxicol In Vitro* 28, 1482-1497.
- 8) Ramirez T., Stein N., Aumann A., Remus T., Edwards A., Norman K.G., Ryan C., Bader J.E., Fehr M., Burleson F., Foertsch L., Wang X., Gerberick F., Beilstein P., Hoffmann S., Mehling A., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2016). Intra- and inter-laboratory reproducibility and accuracy of the LuSens assay: A reporter gene-cell line to detect keratinocyte activation by skin sensitizers. *Toxicol In Vitro* 32, 278-286.
- 9) ESAC (2016). ESAC opinion on the BASF-coordinated Performance Standards-based validation of the LuSens test method for skin sensitisation testing. Available at: [[http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC103706/esac\\_opinion\\_2016-04\\_lusens\\_final.pdf](http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC103706/esac_opinion_2016-04_lusens_final.pdf)].
- 10) OECD (2015). Guidance Document No 213. Performance Standards for assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. Series on Testing and Assessment. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- 11) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 384: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Validation Study Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 12) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 383: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Peer review Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 13) OECD (2024). Series on Testing & Assessment No 396: Draft Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) test methods; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

- 14) OECD (1992). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 406. Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 15) OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 429. Skin sensitization: Local Lymph Node assay. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 16) OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442A. Skin sensitization: Local Lymph Node assay: DA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 17) OECD (2018). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442B. Skin sensitization: Local Lymph Node assay: BrdU-ELISA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 18) OECD (2023). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 19) OECD (2023). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the AOP Key Event on Activation of Dendritic Cells. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 20) OECD (2016). Series on Testing & 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, Annex 1 and Annex 2. [ENV/JM/MONO\(2016\)29](#). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
- 21) OECD (2023). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/b92879a4-en>.
- 22) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. *Toxicology In Vitro* 27, 1220-1225.
- 23) Kolle, S.N., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2013). Alternative method in practice: Post-validation experience of the skin sensitization in vitro test strategy. *Toxicology Letters* 221, S204.
- 24) Settivari RS, Gehen SC, Amado RA, Visconti NR, Boverhof DR, Carney EW (2015). Application of the KeratinoSens™ assay for assessing the skin sensitization potential of agrochemical active ingredients and formulations. *Regul Toxicol Pharmacol*; 72(2):350-60.



## 補遺：定義

**正確性**：試験法の結果と、容認されている参照値との間の一致の程度。試験法の性能を判断する尺度であり、「妥当性」の一側面である。この用語はしばしば、試験法の正しい結果の割合を意味する「一致度」と同義で用いられることが多い（3）。

**AOP（Adverse Outcome Pathway [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 相酵素の遺伝子の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。

**CV**：細胞生存率

**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。

**CV75**：細胞生存率が 75% となる濃度の推定値。

**EC1.5**：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。

**ルシフェラーゼ活性誘導倍率**：同じ溶剤／溶媒に曝露した対照細胞の発光量（ブランク値を減じる）に対する、処理後細胞の発光量（ブランク値を減じる）の比を表す。

**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**：曝露後に生命体、系、または個体群（副次集団）に有害作用を生じる可能性のある作用因子または状況に本来備わっている性質。

**IATA（Integrated Approach to Testing and Assessment [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特定（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／効力および曝露）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。

**Imax**：溶剤（陰性）対照との比較により得られ、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 結合タンパク質 1 は、Nrf2 活性を制御可能なセンサータンパク質である。非誘導条件下において、センサータンパク質 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 からの Nrf2 の解離が導かれる (4) (5) (6)。

**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。

**陰性対照：**試験系のすべての要素を含み、試験系において陽性反応を誘導しないことが分かっている物質を用いて処理したサンプル。このサンプルは被験物質で処理されたサンプル、およびその他の対照サンプルと共に取り扱われる。

**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関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 (4) (5) (6)。

**性能標準：**妥当性の検証が行われた試験法に基づき、それと機序および機能的に類似した新提案試験法が先行試験に匹敵するか否かを評価するための基準。性能標準には、(i) 試験法において不可欠な要素、(ii) 妥当性の検証が行われた試験法において許容できる性能を示した物質の中から選定された参照物質を示した最小限のリスト、および (iii) この参照物質の最小リストを用いて評価した場合に新提案試験法が実証すべき、妥当性の検証が行われた試験法で得られるものに匹敵する正確性および信頼性の水準、が含まれる (3)。

**陽性対照：**試験系のすべての要素を含み、陽性反応を誘導することが分かっている物質を用いて処理をされたサンプル。陽性対照の反応の経時的変動を確実に評価するためには、陽性反応が過度であってはならない。

**習熟度評価用物質：**性能標準に含まれる参照物質のうち、標準的な試験法の実施に必要な技術的能力を証明するために実験室で使用する物質。これらの物質の選定基準としては、通常、幅広い反応を代表する物質であること、市販されていること、高品質の参照値が利用できることが挙げられる。

**参照化学物質 (物質)：**妥当性の検証が行われた参照試験法によって実証済みの許容基準に、新試験法が適合する能力がある証拠を示す目的で用いられる物質のセット。参照物質は、試験法の使用が予想される物質クラスを代表すべきであり、また、試験法の使用が予想される物質から生じると予想される反応をすべて、強いものから弱いもの、および陰性のものまで代表する必要がある。

**妥当性：**試験とその対象となる作用との関連性、およびその試験が特定の目的にとって意義や有用性があることの是非を説明するもの。その試験が試験対象となる生物学的作用を正確に測定または予測する程度を示す。妥当性では、試験法の正確度 (一致度) も考慮される (3)。

**信頼性：**同じ試験手順を用いて実施した場合に得られる長期的な施設内および施設間再現性の程度を表す



尺度。施設内および施設間再現性、ならびに施設内併行精度を算定することで評価する（3）。

**再現性：**同じ試験手順を用いて同じ物質について試験を実施した場合に得られる結果が一致していること（「信頼性」参照）（3）。

**感度：**試験方法によって正確に分類されるすべての陽性の化学物質または活性のある化学物質の割合。断定的な結果をもたらす試験法の正確度を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で考慮すべき重要な事項である（3）。

**溶剤／溶媒対照：**被験物質は除いているが、用いる溶剤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。同じ溶剤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：**試験方法によって正確に分類されるすべての陰性の化学物質または不活性な化学物質の割合。断定的な結果をもたらす試験法の正確度を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で考慮すべき重要な事項である（3）。

**物質：**自然の状態の、または何らかの製造工程で得られる化学元素とその化合物。その製品の安定性を保つために必要な添加物や、製造過程由来の不純物はすべて含まれるが、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される可能性のあるすべての溶剤は除く（1）。

**被験物質：**「被験物質」という用語は、試験の対象物を指す場合に用いられる。

**国際連合の化学品の分類および表示に関する世界調和システム（United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals : UN GHS）：**ヒト（雇用者、労働者、輸送者、消費者および緊急時対応者など）および環境を保護することを目的として有害作用に関する情報を伝達するために、物理的危険性、ならびに健康および環境有害性に基づいてその種類および程度を標準化し、ピクトグラム、注意喚起語、危険有害性情報、注意書きおよび安全データシートなど、対応する伝達要素を取り扱うことで化学品（物質および混合物）の分類を提案するシステム（1）。

**UVCB：**組成が未知または変化する物質、複雑な反応生成物または生物材料。

**検証済み標準試験法（validated reference method : VRM）：**科学的に妥当であると最初に是認された方法のことで、性能に基づくバリデーション試験において参照として用いられる。

**妥当な試験法：**特定の目的に対して妥当性および信頼度が十分であるとみなされる、科学的に有効な原理に基づく試験方法。決して、絶対的な意味で試験方法が妥当であるわけではなく、定められた目的に関して妥当であるにすぎない（3）。

**ゼノフリー：**使用する細胞と同一の種（本件に関してはヒト）に由来しない成分を一切含まないこと。異種由来成分を含まない。

## 参考文献

- 1) United Nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev07/07files\\_e0.html](https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html)
- 2) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- 3) 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. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1, 45-49.

# 付録 IA：In vitro 皮膚感作性： 角化細胞株レポーターアッセイ KeratinoSens™試験法

## 最初に考慮すべき事項、適用および限界

1. 本試験ガイドライン 442D の本付録にて詳述する試験法は、皮膚感作性の AOP における第二のキーイベント、すなわち角化細胞活性化を対象とするものであり (1)、ルシフェラーゼを利用して、Nrf2 を介した抗酸化剤応答配列 (ARE) 依存性遺伝子の活性を評価する。皮膚感作性物質は ARE によって調節される遺伝子を誘導することが報告されている (2) (3)。皮膚感作性物質のような小型の求電子性物質は、センサータンパク質である Keap1 (Kelch 様 ECH 結合タンパク質 1) に作用する。すなわち、Keap1 のシステイン残基の共有結合が修飾されることで、転写因子 Nrf2 (核因子 - 赤血球 2 - 関連因子 2) からの解離が起こる。解離した Nrf2 はその後、第 II 相解毒酵素遺伝子などの ARE 依存性遺伝子を活性化する (2) (4) (5)。
2. in vitro 角化細胞株レポーターアッセイ KeratinoSens™試験法 (以下、KeratinoSens™試験法) は、バリデーション試験が行われ (3) (6) (7)、次いで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) による独立した第三者評価が実施された (8)。KeratinoSens™試験法は、有害性の分類のために皮膚感作性物質と非感作性物質を識別する目的で 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 (8)。
3. 本試験法の独立したピアレビュー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と、KeratinoSens™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 (8)。KeratinoSens™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 (8)。本試験法の評価およびピアレビューに 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™試験法による皮膚感作性物質 (すなわち、UN GHS 区分 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 (8)。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%) (7)。これらの情報は、KeratinoSens™試験法が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。しかし、本試験法は、確定方式または IATA に照らし、本ガイドラインの「概要」の段落 7 および段落 8 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™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、皮膚感作性に関する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結果は、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。
4. 現在入手可能なデータにより、KeratinoSens™試験法は多様な有機官能基、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、および物理化学的特性を有する被験化学物質に適用できることが示された (3) (6) (7) (8)。本試験法は、曝露用培地に可溶であるか、または安定した分散液 (すなわち、被験物質が沈殿することも、溶剤から分離して別な相に移行することもないコロイドまたは懸濁液) となる被験物質に適用可能である。最終的に必要とされる最大濃度である 2,000  $\mu\text{M}$  において、これらの条件を満たさない被験物質は、これよりも低濃度で試験できる場合がある。このような場合、結果が陽性の基準を満たしていれば、被験物質は皮膚感作性物質であると判断できる。最高濃度が 1,000  $\mu\text{M}$  未満であって細胞毒性に達していない濃度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 32 の予測モデル参照)。被験物質が可溶である最大濃度が 1,000  $\mu\text{M}$  未満で、細胞毒性 (生存率が 70% 未満) に達している場合は、陰性の基準を適用できる。一般に、LogP が 7 を超える単一成分物質は曝露用培地に不溶のことがあるが、溶解性または安定な分散液が得られたことが文献に記載がある場合は、試験を実行できる可能性がある。

5. 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。これは、Keap1-Nrf2-ARE 経路の活性化をもたらす主要な機序は、ストレッサーと Keap-1 の求核性チオール (システインのスルフヒドリル基) との求電子反応であると考えられるためである。この不確実性に対処するには、特にシステインとリジンの反応性を識別できるアッセイの場合、ペプチド結合性試験から得られる相補的情報が役立つ場合がある。さらに、使用する細胞株の代謝能力が限定的である (10) ために、また、本試験法の実験条件のために、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。しかし、プレハプテン (すなわち、自動酸化によって活性化される化学物質) およびプロハプテン (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) の多くは、AOP の第一から第三のキーイベントを対象とする試験法の組み合わせによって十分に特定されているため、一般に、陰性結果を分類の裏付けに用いることができる (12) (20) (34)。一方、感作物質としての作用はないが、化学的ストレッサー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 (8)。最後に、ルシフェラーゼ酵素反応に干渉する被験物質は、細胞に基づくアッセイにおける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 (13)。例えば、1  $\mu\text{M}$  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 (14)。結果として、植物性エストロゲン、または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化合物が高濃度に存在する場合、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 (14)。他の特定のカテゴリーに属す被験物質に KeratinoSens™ 試験法が適用できない証拠が示され得る場合、本試験法は、そのようなカテゴリーに用いるべきではない。

6. 皮膚感作性物質 (すなわち UN GHS 区分 1) と非感作性物質を識別するのに加え、KeratinoSens™ 試験法は濃度-反応情報も提示し、そうした情報は IATA などの統合的アプローチの中で用いられて感作性の強度評価に寄与する場合がある (11) (15)。KeratinoSens™ 試験法の結果を他の情報源と組み合わせて使用する方法の例が文献として報告されている (7) (11) (16) (17) (18) (19) (20)。具体的には、KeratinoSens™ 試験法の用量反応データをペプチド結合性試験の定量的データと組み合わせて、LLNA およびヒト対象試験における強度評価に利用することが報告されており (21)、また、LLNA の強度に関するベイズ流の統合的試験戦略 (Integrated testing strategy : ITS) にも用いられた。 (11) (22)。



さらに、ヒトにおける強度を具体的にどのように取り扱うかについての評価も実施された（23）。また、特定の化学物質クラスの強度を評価する目的での **KeratinSens™** 試験法の利用についても報告されている（21）（24）。

7. 定義については「概要」の補遺 I に示されている。

## 試験の概要

8. **KeratinSens™**試験法には、ヒト **AKR1C2** 遺伝子の抗酸化剤応答配列（**ARE**）の調節下にあるルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定的に導入した、ヒト角化細胞由来の不老化した接着細胞株を使用する（25）。**AKR1C2** 遺伝子は皮膚感作性物質によってアップレギュレートされることが知られている（26）（27）。この細胞株は、**ARE** エlementと融合した恒常のプロモーターの転写制御下にあるルシフェラーゼ遺伝子を含む。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、この遺伝子組換え細胞株におけるルシフェラーゼシグナルの **Nrf2** 依存性が確認されている（28）。したがって、求電子性の被験物質に細胞を曝露した後、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を（発光検出によって）定量的に測定することで、これを **Nrf2** 転写因子活性化の指標とすることができる。

9. **KeratinSens™**試験法では、被験物質が、細胞生存率に有意な影響を及ぼさないと定めた濃度（すなわち、1,000  $\mu$ M 未満かつ細胞生存率が 70%超となる濃度）よりも低い濃度で、所定の閾値を超える（すなわち、1.5 倍以上または 50%超の上昇）統計的に有意なルシフェラーゼ活性を誘導する場合、その被験物質は陽性と判定される（3）（6）。そのために、溶剤（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<sub>max</sub>**）を測定する。さらに、数段階の濃度の被験物質に細胞を曝露することで、閾値を超える統計的に有意なルシフェラーゼ活性誘導に必要な濃度（すなわち、**EC<sub>1.5</sub>** 値）を、数段階の濃度の被験物質から得られた用量反応曲線を用いて補間で算出する（算出については段落 26 を参照）。また、ルシフェラーゼの誘導が細胞毒性に達しない濃度で生じるかどうかを評価するため、並行して細胞毒性を測定する。

10. 本試験ガイドラインを厳守した **KeratinSens™**試験法を日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、この付録の補遺 1 に記載された習熟度評価用物質 10 種を用いて技術的習熟度を立証する。

11. **KeratinSens™ VRM** に類似した新規または改変型の **in vitro** 角化細胞株レポーターアッセイのバリデーションを支援し、また、適切な時機に本試験ガイドラインをそれらの試験法を含むように改定する目的で、性能標準（**PS**）（29）を利用することができる。OECD によってこれらの試験法のレビューが行われ、本試験ガイドラインに含まれている場合には、**PS** に従ってバリデーションを受けた試験法についてのみ、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。

## 試験の手順

12. **KeratinSens™**試験法については **EURL ECVAM** の動物実験代替法データベースサービス（**Database on Alternative Methods to Animal Experimentation : DB-ALM**）プロトコールが利用可能であり、本試験法を実験施設内で実施・使用する際にはこのプロトコールを採用すべきである（9）。本試験法を実施する実験施設は、ルシフェラーゼ遺伝子の商業的利用に関するライセンスを含む標準的な契約を結ぶこ

とによって、本試験法の開発企業<sup>2</sup>から **KeratinSens™**試験法に使用する組換え細胞株を入手することができる。ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイは、プロメガ（Promega）社との限定使用ライセンスも課されており、プロメガ社から購入した発光測定アッセイ用試薬を使用する必要がある。**KeratinSens™**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。さらに、ヒト関連試薬を用いて **KeratinSens™**試験法をゼノフリー培養条件に改変する方法について、この付録の補遺 2 に詳述する（33）。しかし、**KeratinSens™**試験法に使用する血清の種別を決定する前には、関連する規制当局に相談することが推奨される。

### 角化細胞培養液の調製

13. 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、**KeratinSens™**組換え細胞株を使用する。**KeratinSens™**細胞は、入手次第、試験法プロトコールに従って増殖させ（例：2～4 回の継代）、均一なストックの状態での冷凍保存する。このオリジナルストックから起こした細胞は、継代回数が最大 25 回となるまで増殖可能であり、**DB-ALM** プロトコールに記載の方法に従って、維持／増殖用培地（血清および遺伝子の維持用としてジェネティシンを含有する **Dulbecco** 改変イーグル培地：**DMEM**）を用いた日常的な試験に用いられる（9）。

14. 試験に際しては、細胞は 80～90%コンフルエントとし、完全なコンフルエントにまで増殖させないように留意する。試験前日に細胞を回収し、細胞密度が 10,000 cells/ウェルとなるように 96 ウェルプレートに播種する。すべてのウェルで細胞数の分布が確実に均一となるよう、播種作業中に細胞が沈降しないよう注意が必要である。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、ルシフェラーゼ活性測定用として 3 回の反復を実施し、また並行して、細胞生存率測定用として最低 1 回の反復を実施する。

### 被験物質および対照物質の調製

15. 被験物質および対照物質は、試験当日に調製する。被験物質はジメチルスルホキシド（**DMSO**、CAS 番号：67-68-5、純度 99%以上）に溶解し、希望する最終濃度（例えば、200 mM）とする。**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地に溶解し、その溶液を濾過などによって滅菌する。分子量（MW）が不明の被験物質の場合、ストック溶液を初期設定濃度（40 mg/mL または 4%（w/v））に調製する。**DMSO** 以外の溶媒、水、または培地を用いる場合には、十分な科学的根拠を提示する。

16. **DMSO** または適切な溶剤（すなわち、滅菌水または培地）を用いて被験物質のストック溶液を段階希釈し、12 段階の主要濃度のサンプルを得る（0.098～200 mM）。用いる溶剤に関わらず、次に上記主要濃度のサンプルを血清含有培地でさらに 25 倍希釈し、最終的な処理にはこれをさらに 4 倍に希釈して用いるため、被験物質の最終濃度は 0.98～2,000  $\mu$ M の範囲となる（希釈倍率 2 の段階希釈に基づく）。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。分子量が不明の被験物質の場合、**DMSO** または適切な溶剤を用いて段階希釈を行い、希望する最終濃度（例えば、0.196～400  $\mu$ g/mL で 12 段階）の被験物質溶液を得る。

17. 同時に使用する溶剤／溶媒対照（すなわち **DMSO**）は、反復のたびに試験を行い、1 プレートあたり十分な数のウェル（すなわち 6 ウェル）分を調製する。溶剤／溶媒対照では、主要濃度について段落 16

<sup>2</sup> Givaudan Schweiz AG, CH-8310 Kempthal

の記載と同じ希釈を行うため、最終的な溶剤／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ており、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。DMSO に不溶のために水で希釈した被験物質の場合、最終的な試験溶液のウェルすべてにおいて、DMSO 濃度は他の被験物質および対照物質の場合と同じく 1%となるように調整しなければならない。この溶剤／溶媒対照（すなわち DMSO）は、KeratinSens™試験法の陰性対照でもある。

18. 試験系が適切に反応していることを示すため、同時に使用する陽性対照は、DB-ALM プロトコール（9）の記載に従い、反復のたびに十分な数のウェルにおいて試験を行う必要がある。例えば、KeratinSens™試験法の各反復では 5 段階の濃度のシンナムアルデヒド（CAS 番号：14371-10-9、純度 98%以上）が用いられる。6.4 mM のストック溶液から DMSO 中 5 段階の主要濃度（0.4～6.4 mM）に調製し、これを段落 16 に記載の方法で希釈することで、陽性対照の最終的な濃度は 4～64  $\mu\text{M}$  の範囲となる。これ以外に、ほぼ中央の濃度範囲で  $\text{EC}_{1.5}$  値を示す適切な陽性対照は、同等の実行許容基準を満たす歴史的データが得られる場合は利用できる。

### 被験物質および対照物質の適用

19. 被験物質および陽性対照物質ごとに、予測（陽性または陰性）を得るための実験 1 セットが必要である。1 セットの実験は少なくとも 2 回の独立した繰り返し試行からなり、1 試行は 3 回の反復測定を含む（すなわち、1 セットの実験で  $n = 6$  回）。独立した 2 回の繰り返し試行間で結果が一致しない場合、3 回の反復測定からなる 3 回目の繰り返し試行を実施する（すなわち、 $n = 9$  回）。独立した繰り返し試行は、新たに調製した被験物質ストック液および別に回収した細胞を用いて、別の日に実施する。ただし、細胞の継代回数は同じでもよい。

20. 細胞は段落 14 記載のように播種した後、96 ウェルプレートで 24 時間培養する。次いで、培地を除去して新たな培地（DB-ALM プロトコール（9）に記載の通り、血清含有、ジェネティシン不含の培地 150  $\mu\text{L}$ ）と交換し、ここに 25 倍希釈した被験物質および対照物質 50  $\mu\text{L}$  を添加する。バックグラウンド値を評価するため、1 プレートあたり少なくとも 1 ウェルは空のまま（無細胞かつ無処置）とする。

21. 次に、この処理プレートを 5%  $\text{CO}_2$  存在下、 $37\pm 1^\circ\text{C}$  で約 48 時間インキュベートする。被験物質を加えてのインキュベーションの間、揮発性の被験物質の蒸発や、ウェル間の被験物質による交差汚染を予防する目的で、例えばプレートをアルミホイルで被覆するなどして注意を払う必要がある。

### ルシフェラーゼ活性の測定

22. 適切な発光測定値を保証するには、以下の要因が極めて重要である。

- 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、十分な発光力を有するルシフェラーゼ基質の使用
- 適切で安定なバックグラウンドレベル

試験に先立ち、この付録の補遺 3 に記載の通り品質管理実験を実施し、これらの要因が満たされていることを確認する。

23. 48 時間にわたって被験物質および対照物質に曝露した後、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、十分な時間（例：室温で 20 分間）静置する。
24. 次に、細胞溶解物を含むプレートと、以下のプログラムを設定したルミノメーターにセットして測定を行う。すなわち、(i) 各ウェルにルシフェラーゼ基質（50  $\mu$ L）を添加する。(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。他の設定を用いる場合には（使用するルミノメーターの機種の違いなど）、その正当性を証明すること。さらに、この付録の補遺 3 の品質管理実験において要件が十分に満たされている場合は、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

25. KeratinoSens™細胞の生存率の測定では、48 時間の曝露の終了後、培地を 5 mg/mL の 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% CO<sub>2</sub> 存在下、37±1°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、適切な細胞溶解試薬を使用し、十分な時間をかけて細胞を溶解する（例：10% SDS を加えて一晩静置）。振盪後、本試験法のプロトコール (9) に従って、光度計を用いて 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

26. KeratinoSens™試験法の場合、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観察された、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<sub>1.5</sub> 値
  - 細胞生存率が 50% 減および 30% 減となる濃度である IC<sub>50</sub> および IC<sub>30</sub> 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、個々の繰り返し試行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

$L_{\text{sample}}$  は、被験物質のウェルにおける発光測定値

$L_{\text{blank}}$  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

$L_{\text{solvent}}$  は、細胞および溶剤（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<sub>1.5</sub> は式 2 に従って線形補間により算出し、全体の EC<sub>1.5</sub> は、個々の繰り返し試行の幾何平均値として算出する。

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



$$I_b - I_a$$

ここで

$C_a$  は、誘導倍率が 1.5 超となる最低濃度 ( $\mu\text{M}$ )

$C_b$  は、誘導倍率が 1.5 未満となる最高濃度 ( $\mu\text{M}$ )

$I_a$  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。

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

ここで

$V_{\text{sample}}$  は、被験物質のウェルにおける MTT 吸光度の測定値

$V_{\text{blank}}$  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

$V_{\text{solvent}}$  は、細胞および溶剤（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、個々の繰り返し試行の幾何平均値として算出する。

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

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、細胞生存率の減少率が  $x\%$  超となる最低濃度 ( $\mu\text{M}$ )

$C_b$  は、細胞生存率の減少率が  $x\%$  未満となる最高濃度 ( $\mu\text{M}$ )

$V_a$  は、細胞生存率の減少率が  $x\%$  超となる最低濃度における細胞生存率

$V_b$  は、細胞生存率の減少率が  $x\%$  未満となる最高濃度における細胞生存率

27. ルシフェラーゼ活性の誘導倍率が 1.5 倍以上 ( $\geq$ ) となる各濃度について、3 回の反復サンプルにおける発光測定値と溶剤／溶媒対照のウェルにおける発光測定値とを比較することによって、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）判定し、ルシフェラーゼ活性の誘導が統計的に有意 ( $p < 0.05$ ) であるかどうかを評価する。さらに、ルシフェラーゼ活性の誘導倍率が 1.5 倍以上となる最低濃度において、有意な細胞毒性作用が生じていないこと、また、この濃度が  $IC_{30}$  値を下回っていること、すなわち、細胞生存率の減少率が 30% 以下であることを確認する。加えて、少なくとも 2 段階の連続した濃度段階において、70% を超える細胞生存率が示されていることが必要であり、そうならない場合は濃度範囲を調整しなければならない。

28. 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、これが被験物質に特異的な結果なのか、実験のアーティファクトに起因するのかを検証する。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、低い方の濃度（閾値 1.5 に最初に交差する場合の濃度）を報告すること。

29. KeratinoSens™試験法において、統計的には有意でない 1.5 倍以上のルシフェラーゼ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ようなまれな事例の場合、統計的に有意な閾値 1.5 以上の誘導が、細胞毒性を示さない濃度で得られた場合に限り、この繰り返し試行の結果を妥当かつ陽性であるとみなす。

30. 最後に、KeratinoSens™試験法において、検討の対象とした最低濃度（すなわち 0.98  $\mu\text{M}$ ）においても 1.5 倍以上の誘導を生じる被験物質については、用量反応曲線の目視確認に基づき、EC<sub>1.5</sub> 値は 0.98 未満として設定する。

### 許容基準

31. KeratinoSens™試験法を用いる場合、以下の許容基準を満たすこと。

- 陽性対照であるシン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  $\mu\text{M}$ ）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。
- 陽性対照の EC<sub>1.5</sub> 値は、実施施設において定期更新されている既存平均値の標準偏差の 2 倍以内（例えば、バリデーションデータセットに基づく 7~30  $\mu\text{M}$  の間）であること。さらに、シンナムアルデヒド 64  $\mu\text{M}$  における 3 回の反復測定について、その誘導倍率の平均値が 2~8 であること。後者の基準が満たされない場合、シンナムアルデヒドの用量反応を慎重に確認すべきであり、陽性対照であるシン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。
- 溶剤／溶媒対照（すなわち DMSO）の発光測定値について、その変動係数の平均値が、各繰り返し試行において 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

32. KeratinoSens™による予測では、2 回の繰り返し試行のうち 2 回とも、または 3 回の繰り返し試行のうち 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、KeratinoSens™による予測では陰性とみなす（図 1）。

- $I_{\text{max}}$  が 1.5 倍以上（ $\geq$ ）であり、溶剤／溶媒対照との比較において統計的有意差が認められること（対応のないスチューデントの両側 t 検定により判定）。
- ルシフェラーゼ活性の誘導倍率が 1.5 倍以上となる最低濃度（すなわち、EC<sub>1.5</sub> の判定濃度）において、細胞生存率が 70%超（ $>$ ）であること。
- EC<sub>1.5</sub> 値が 1,000  $\mu\text{M}$  未満（ $<$ ）であること（または、分子量不明の被験物質の場合は 200

µg/mL 未満であること）。

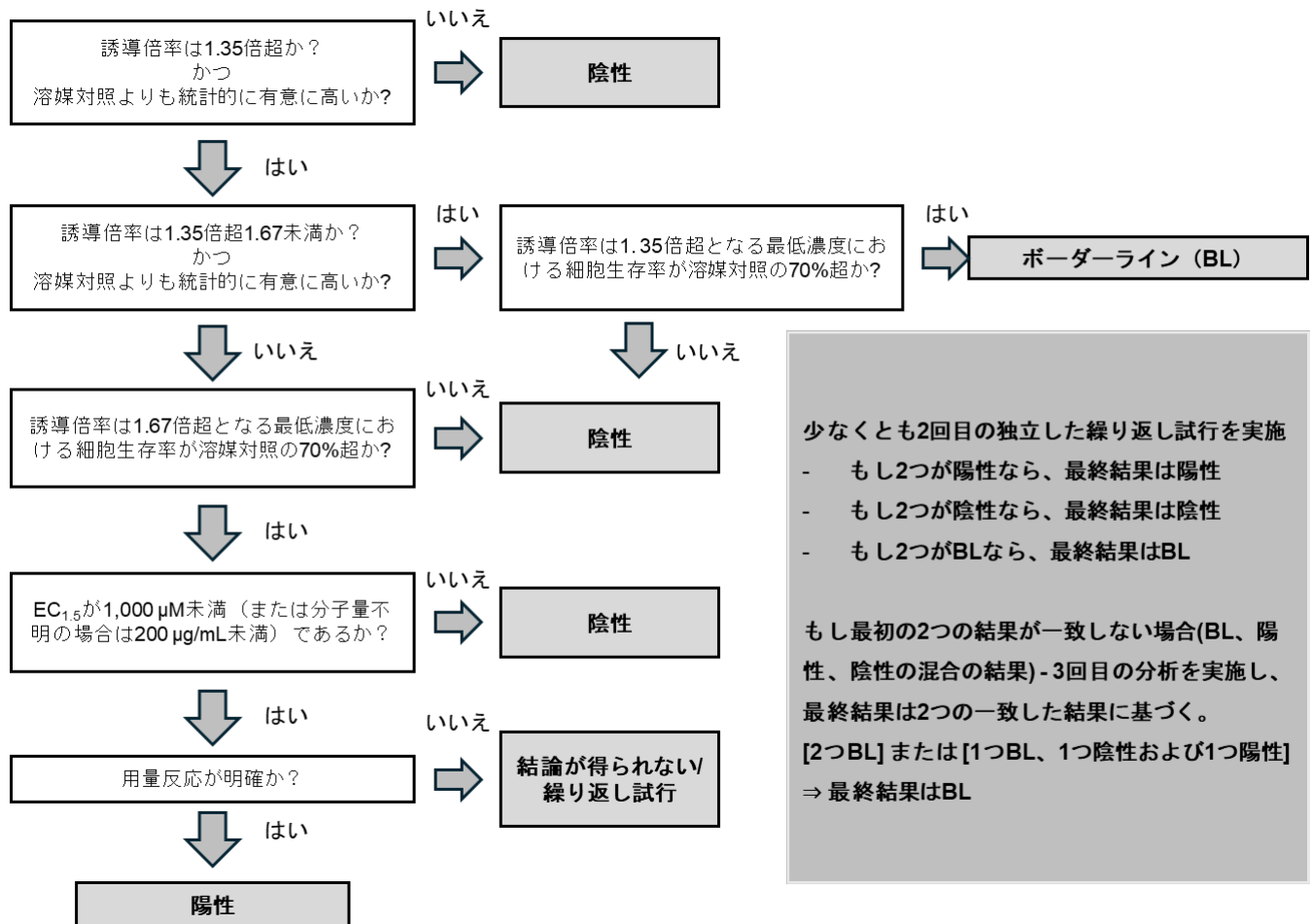
- ルシフェラーゼの誘導に用量依存的な増加（または、段落 28 で述べた二相性の反応）が認められること。

所定の繰り返し試行において、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依存性の増加を認めることができない場合、この繰り返し試行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、検討した最高濃度が 1,000 µM 未満（または分子量不明の被験物質の場合 200 µg/mL 未満）であって、その濃度において細胞毒性（細胞生存率が 70%未満）に達していない場合に得られた陰性結果も、結論が得られないとみなす（段落 4 参照）。

図 1. ボーダーラインを考慮した KeratinoSen 予測モデルのフローチャート：境界域結果の判定に向けた複数回の実行。

KeratinoSens™による予測は、確定方式または IATA の枠組みの中で、また、本ガイドラインの「概要」の段落 7 および段落 8 の条項に従って検討すること。

1回の完全な繰り返し試行の手順：



陽性判定の元の閾値は 1.5 倍の誘導であり、このボーダーライン周辺の統計的に導出された境界域は 1.35~1.67 倍である。

33. 細胞毒性濃度に極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の場合、ある繰り返し試行では、細胞毒性を示さない濃度（すなわち、EC<sub>1.5</sub> の判定濃度が IC<sub>30</sub> 未満）で陽性になる一方、別の繰り返し試行では、細胞毒性を示す濃度（すなわち、EC<sub>1.5</sub> の判定濃度が IC<sub>30</sub> 超）でしか陽性が得られないことがある。このような被験物質は、より小さな希釈倍率（例えば、ウェル間で 1.33 倍または√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、誘導が起きたのが細胞毒性濃度であったかどうかを判定する (3)。



## 試験報告書

34. 試験報告書には、以下の情報を含めること。

### 被験物質

- 単一成分物質
  - IUPAC または CAS 名称、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはその他の識別子（バッチ／ロット番号および有効期限など）といった化学的識別情報
  - 外観、水への溶解度、DMSO への溶解度、分子量、および入手可能なその他の関連する物理化学的特性
  - 曝露用培地における溶解度または安定な分散液に関する記述
  - 純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的識別情報など
  - 該当する場合は、試験の前処理（加温、粉碎など）
  - 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：
  - 成分の化学的識別情報（上記参照）、純度、定量的組成、ならびに関連のある物理化学的特性（上記参照）などによる可能な限りの特徴付け
  - 外観、水への溶解度、DMSO への溶解度、および入手可能なその他の関連する物理化学的特性
  - 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
  - 曝露用培地における溶解度または安定な分散液に関する記述
  - 該当する場合は、試験の前処理（加温、粉碎など）
  - 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
  - IUPAC または CAS 名称、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはその他の識別子などの化学的識別情報
  - 外観、水への溶解度、DMSO への溶解度、分子量、および入手可能かつ適用可能なその他の関連する物理化学的特性

- 純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的識別情報など
- 該当する場合は、試験の前処理（加温、粉碎など）
- 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、適切な実効許容基準であることを示した既存陽性対照結果の歴史的データ
- 溶剤／溶媒／陰性対照
  - IUPAC または CAS 名、CAS 番号、および／またはその他の識別子などの化学的識別情報
  - 純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的識別情報など
  - 本試験ガイドラインのこの付録に記載されているもの以外の溶剤／溶媒／陰性対照を用いる場合、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特性
  - 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剤／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所在地
- 使用する試験法の説明
- 使用する細胞株、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分布を確保するために行われた措置（段落 14 参照）
- 使用したルミノメーター（例えば機種）および機器の設定内容、使用したルシフェラーゼ基質、ならびにこの付録の補遺 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、または本試験法の長期的な再現性の性能を立証するのに用いた手順

#### 試験手順

- 繰り返し試行数および反復測定数
- 使用した被験物質の濃度、適用手順、および曝露時間（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

- 繰り返し試行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、 $IC_{50}$ 、 $IC_{30}$ ）、ならびに個々の繰り返し試行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
- 実験ごとに溶剤／溶媒／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観察結果の記述

## 結果の考察

- KeratinoSens™試験法により得られた結果の考察
- 他の関連情報が入手可能な場合、IATA の範囲内における本試験法の結果の考察

## 結論

## 参考文献

- 1) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1, 45-49.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens<sup>TM</sup> 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](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation).
- 9) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens<sup>TM</sup>, 17 pp. Available: [<http://ecvam-dbal.m.jrc.ec.europa.eu/>].
- 10) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle 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, 1683-1699.
- 11) 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.
- 12) Casati S., Aschberger K., Asturiol D., Basketter D., Dimitrov S., Dumont C., Karlberg A.T., Lepoittevin J.P., Patlewicz G., Roberts D.W., Worth A. (2016). Ability of non-animal methods for skin sensitisation to detect pre- and pro-haptens: Report and recommendations of an EURL ECVAM expert meeting. EUR 27752 EN. Available at : <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-status-reports/pre-prohaptens-workshop-report>.
- 13) 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.
- 14) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 15) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).



- 16) Bauch C., Kolle 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.
- 17) 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.
- 18) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle 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.
- 19) Urbisch D., Mehling A., Guth K., Ramirez T., Honarvar N., Kolle S., Landsiedel R., Jaworska J., Kern P.S., Gerberick F., Natsch A., Emter R., Ashikaga T., Miyazawa M., Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.
- 20) Urbisch D., Becker M., Honarvar N., Kolle S.N., Mehling A., Teubner W., Wareing B., Landsiedel R. (2016). Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Non-animal Test Methods for Skin Sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* 29, 901-13.
- 21) Natsch A., Emter R., Gfeller H., Haupt T., Ellis G. (2015). Predicting Skin Sensitizer Potency Based on In Vitro Data from KeratinoSens and Kinetic Peptide Binding: Global Versus Domain-Based Assessment. *Toxicol. Sci.* 143, 319-332.
- 22) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch. Toxicol.* 89, 2355-2383.
- 23) Strickland J, Zang Q, Paris M, Lehmann DM, Allen D, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Casey W, Kleinstreuer N (2017). Multivariate models for prediction of human skin sensitization hazard. *J. Appl. Toxicol.* 37, 347-360.
- 24) Delaine T, Ponting DJ, Niklasson IB, Emter R, Hagvall L, Norrby PO, Natsch A, Luthman K, Karlberg AT (2014). Epoxyalcohols: bioactivation and conjugation required for skin sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 1860-1870.
- 25) Wasserman W.W., Fahl W.E. (1997). Comprehensive analysis of proteins which interact with the antioxidant responsive element: correlation of ARE-BP-1 with the chemoprotective induction response. *Arch. Biochem. Biophys.* 344, 387-396.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) OECD (2015). Guidance Document No 213. Performance Standards for assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. Series on Testing and Assessment. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>

- 30) 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. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 31) United nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [[https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev07/07files\\_e0.html](https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html)]
- 32) Basketter D.A., Alépée N., Ashikaga T., Barroso J., Gilmour N., Goebel C., Hibatallah J., Hoffmann S., Kern P., Martinozzi-Teissier S., Maxwell G., Reisinger K., Sakaguchi H., Schepky A., Tailhardat M., Templier M. (2014). Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatitis* 25, 11-21.
- 33) Belot N, Sim B, Longmore CL, Roscoe L, Treasure C. (2017) Adaptation of the KeratinoSens™ skin sensitisation test to animal-product-free cell culture. *ALTEX*. 2017 Mar 16. doi: 10.14573/altex.1701311
- 34) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? *Regul Toxicol Pharmacol*, 82, 147-155.

## 付録 IA—補遺 1：習熟度評価用の物質

## In vitro 皮膚感作性：角化細胞株レポーターアッセイ KeratinoSens™ 試験法

試験ガイドライン 442D のこの付録に準拠した試験法を日常的に用いるのに先立ち、表 1 において推奨される習熟度評価用の 10 物質について、KeratinoSens™により期待される予測結果を正確に取得し、また、習熟度評価用の 10 物質のうち 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<sub>1.5</sub> 値および IC<sub>50</sub> 値を取得することによって、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、皮膚感作性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 KeratinoSens™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.KeratinoSens™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 形状	LLNA における予 測 (1)	ヒトに関する区分 (2)	KeratinoS ens™に よる予測 (3)	EC <sub>1.5</sub> (μM) の 基準範囲 (4)	IC <sub>50</sub> (μM) の基準範囲 (5)
サリチル酸	69-72-7	固体	非感作性物質	区分 6	陰性	> 1000	> 1000
乳酸	50-21-5	液体	非感作性物質	区分 6	陰性	> 1000	> 1000
グリセロール	56-81-5	液体	非感作性物質	区分 6	陰性	> 1000	> 1000
イソプロパ ノール	67-63-0	液体	非感作性物質	区分 5	陰性	> 1000	> 1000
ジメタクリ ル酸エチレ ングリコー ル	97-90-5	液体	感作性物質 (弱い [weak] )	区分 4	陽性	5 - 125	> 500
シンナミル アルコール	104-54-1	固体	感作性物質 (弱い [weak] )	区分 3	陽性	25 - 175	> 1000
2-メルカプ トベンゾチ アゾール	149-30-4	固体	感作性物質 (中等度 [moderate] )	区分 3	陽性	25 - 250	> 500

4- (メチル アミノ) フ ェノール硫 酸塩	55-55-0	固体	感作性物質 (強い [strong])	区分 3	陽性	< 12.5	20 - 200
メチルジブ ロモグルタ ロニトリル	35691-65- 7	固体	感作性物質 (強 い [strong])	区分 2	陽性	< 20	20 - 100
2,4- ジ ニ ト ロ ク ロ ロ ベ ンゼン	97-00-7	固体	感作性物質 (非常に強い [extreme])	区分 1	陽性	< 12.5	5 - 20

注：(1) *in vivo* における危険有害性（および強度）の予測結果は、LLNA データに基づく [7]。*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）[15] により提唱された基準を用いて得られている。(2) Basketter らによる [32]。区分 1 は「接触アレルギーの明確な証拠を有する」、区分 2 は「しばしば接触アレルギーの原因となる」、区分 3 は「接触アレルギーの一般的な原因である」、区分 4 は「時折接触アレルギーの原因となる」、区分 5 は「まれに接触アレルギーの原因となる」、そして区分 6 は「接触アレルギーの証拠を本質的に欠く」を表す [32]。(3) KeratinoSens™ による予測は、確定方式または IATA の枠組みの中で、また、本ガイドラインの「概要」の段落 7 および段落 8 の条項に従って検討すること。(4) 過去に測定された値に基づく [6]。

## 付録 IA—補遺 2：ゼノフリー細胞培養の達成を目的としたヒト関連試薬使用 KeratinSens™ 試験法の改変

以下に示す KeratinSens™ 試験法の改変法は、ゼノフリー細胞培養を目的として、ヒト関連試薬（ヒト血清および組換え体ヒトトリプシン）を用いて実施することが可能であり、改変後の手法は技術的習熟度の立証（補遺 1 記載）の対象となる（33）。

表 2. 改変の概要

試験法の要素	検証済み標準試験法 (KeratinSens™) (付録 1A)	ゼノフリーへの改変 (この補遺に記載)
血清 <sup>1</sup>	「血清」（DB-ALM プロトコール 155 番ではウシ胎児血清）と記載（段落 13）	10%ヒト血清を指定
細胞毒性の測定 <sup>2</sup>	MTT：4 時間のインキュベーション後、10%SDS にて一晚処理して細胞溶解し、600 nm で測定（段落 25）	MTT（1 mg/mL）：3 時間のインキュベーション後、イソプロパノールで細胞溶解し、570 nm で測定
陽性対照 <sup>2</sup>	シンナムアルデヒド、4～64 µM（段落 18）	シンナムアルデヒド、8～128 µM
トリプシン <sup>1</sup>	指定なし（DB-ALM プロトコール 155 番ではトリプシン EDTA と記載）	非動物性の組換えトリプシン（TrypZean、シグマアルドリッチ、製品番号 T3499）

注：<sup>1</sup>ゼノフリー条件を達成するための改変。<sup>2</sup>その他の改変（33）。

KeratinSens™ 細胞株は、試験目的で使用する前に、10%ヒト血清を用いた通常培養に適応させる必要がある。ヒト血清（ドナープールより入手）は、適切なドナーの承認および細胞培養用途に関する品質管理試験を得ているものを、信頼できる販売元から購入する。どの種類の血清についても、新しいバッチを使用する場合は、そのバッチについて細胞形態、増殖速度、および少なくとも陽性対照に関する  $I_{max}/EC_{1.5}$  値について施設内バリデーションを実施すること。 $I_{max}/EC_{1.5}$  については、代表的な参照物質（少なくとも感作性物質と非感作性物質を 1 種類ずつ）も含めることが望ましい。次いで、正しく機能するバッチは長期使用のために保存する。かつてウシ胎児血清で培養したことがある細胞の場合は、3 継代以上にわたってヒト血清に馴化させる必要がある。細胞が健康な形態を示し、ウシ胎児血清の場合と同等の増殖速度を示す場合は、将来の使用に向けてセルバンクを作成する。KeratinSens™ 細胞株をヒト血清を含む培地で培養する場合は、最適な性能を発揮するために、最大継代回数を 22 回とすべきであること（ヒト血清への馴化に必要な継代回数を含む）に注意が必要である。完全にゼノフリーな細胞培養を達成するには、継代培養中の細胞回収の



際に、非動物性の組換えトリプシン（例えば Trypzean™）を使用すること（33）。他のすべての面では、細胞の培養は、試験ガイドライン 442D のこの付録、および DB-ALM プロトコール（9）における標準 KeratinoSens™細胞株に関する記載と同じ方法で行うこと。

段落 18 に関連して、ヒト関連試薬を用いてゼノフリーに改変した KeratinoSens™ 試験法は、最終濃度範囲が 8~128 µM のシンナムアルデヒド（CAS 番号 14371-10-9、純度 98%超）を陽性対照として使用するよう最適化されている。これ以外に、ほぼ中央の濃度範囲で EC<sub>1.5</sub> 値を示す陽性対照は、同等の実行許容基準を満たす歴史的データが得られる場合は利用できる（33）。

段落 25 に関して、ヒト関連試薬を用いてゼノフリーに改変した KeratinoSens™ 試験法は、以下の細胞毒性評価法を使用するように最適化されている。48 時間の曝露終了後、1 mg/mL の MTT（3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2H-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% CO<sub>2</sub> 存在下、37±1°C で 3 時間インキュベートする。その後、MTT 含有培地を除去してからイソプロパノールを添加し、細胞を溶解する。30 分間の振盪後、光度計を用いて 570 nm における吸光度を測定する。

他のすべての面では、ヒト関連試薬を用いてゼノフリー改変した KeratinoSens™試験法は、試験ガイドライン 442D のこの付録、および DB-ALM プロトコール（9）における標準 KeratinoSens™細胞株に関する記載と同じ方法で行うこと。

## 付録 IA—補遺 3：発光測定値の品質管理

## KeratinSens™試験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プレート上で勾配を生じないこと
- 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、以下に記載の通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）。

表 1.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	ブランク

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

CA＝シンナムアルデヒド、陽性対照（CAS 番号 104-55-2）。濃度の単位は  $\mu\text{M}$  で示されている。

## 品質管理解析により、以下の項目を立証する：

- 行 D において明確なルシフェラーゼ誘導の用量依存的な増加が認められ、 $I_{\text{max}}$  がバックグラウンドの 20 倍超である（ほとんどの場合、 $I_{\text{max}}$  値は 100～300 に達する）
- H7 から H11 のウェルにおいてルシフェラーゼ誘導の容量依存的な増加が認められ、H11 における誘導倍率が 2～8 である
- 行 C および行 E におけるルシフェラーゼ誘導に用量依存的増加を認めない（特に EGDMA の行に存在する活性の強いウェルに隣接して生じ得る光の混入を考慮して、誘導倍率の値が 1.5 未満である（理想的には 1.3 未満である））

- 行 A、B、C、E、F、G 間に統計的有意差を認めない（すなわち、プレート上の勾配を認めない）
- 行 A、B、C、E、F、G、および行 H の DMSO 添加ウェルについて、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）

# 付録 IB：In vitro 皮膚感作性：角化細胞株レポーターアッセイ LuSens 試験法

## 最初に考慮すべき事項、適用および限界

1. 本試験ガイドライン 442D の付録にて詳述する試験法は、皮膚感作性の AOP における第二のキーイベント、すなわち角化細胞活性化を対象とするものであり（1）、ルシフェラーゼを利用して、Nrf2 を介した抗酸化剤応答配列（ARE）依存性遺伝子の活性を評価する。皮膚感作性物質は ARE によって調節される遺伝子を誘導することが報告されている（2）（3）。皮膚感作性物質のような小型の求電子性物質は、センサータンパク質である Keap1（Kelch 様 ECH 結合タンパク質 1）に作用する。すなわち、Keap1 のシステイン残基の共有結合が修飾されることで、転写因子 Nrf2（核因子 - 赤血球 2 - 関連因子 2）からの解離が起こる。解離した Nrf2 はその後、第 II 相解毒酵素遺伝子などの ARE 依存性遺伝子を活性化する（2）（4）（5）。
2. in vitro 角化細胞株レポーターアッセイ LuSens 試験法（以下、LuSens 試験法）は、KeratinoSens™ 試験法の検証済み標準試験（VRM）に基づいた、性能標準を基にしたバリデーション試験が行われ（6）（7）（8）（9）、次いで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）による独立したピアレビューが実施された（10）。LuSens 試験法は、有害性の分類のために皮膚感作性物質と非感作性物質を識別する目的で 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（10）。
3. LuSens 試験法は、細胞培養技術の経験がある実験室への技術移管が可能であることが立証されており、また、施設内および施設間の再現性に関する必要な性能標準を満たした（10）。開発施設において 72 種類の被験物質を対象とした初期研究から得られた追加情報では、LLNA の結果と比較した場合、皮膚感作性物質（すなわち UN GHS 区分 1）を非感作性物質から識別する能力に関して、LuSens 試験法は VRM と同程度の予測能力（正確度 74%、感度 74%、特異度 74%）が示されたことから（7）（10）、同試験法が皮膚感作性の危険有害性の同定に有用であることが示唆された。しかし、本試験法は、確定方式または IATA に照らし、本ガイドラインの「概要」の段落 7 および段落 8 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、LuSens 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、皮膚感作性に関する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結果は、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。
4. 現在入手可能なデータにより、LuSens 試験法は多様な有機官能基、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、および物理化学的特性を有する被験化学物質に適用できることが示された（7）（8）。本試験法は、曝露用培地に可溶であるか、または安定した分散液（すなわち、被験物質が沈殿することも、溶剤から分離して別な相に移行することもないコロイドまたは懸濁液）となる

被験物質に適用可能である。最終的に必要とされる最大試験濃度（すなわち 2,000  $\mu\text{M}$ 、または分子量不明の場合は 2,000  $\mu\text{g/mL}$ ）において、これらの条件を満たさない被験物質は、これよりも低濃度で試験できる場合がある。このような場合、結果が陽性の基準を満たしていれば、被験物質は皮膚感作性物質であると判断できる。最高濃度が 2,000  $\mu\text{M}$  未満（または分子量不明の場合は 2,000  $\mu\text{g/mL}$ ）であって細胞毒性が認められない濃度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 32 の予測モデル参照）。2,000  $\mu\text{M}$  未満（または分子量不明の場合は 2,000  $\mu\text{g/mL}$ ）の試験濃度で、細胞毒性（生存率が 70%未満）に達している場合は、陰性の基準を適用できる。一般に、LogP が 7 を超える単一成分物質は曝露用培地に不溶のことがあるが、溶解性または安定な分散液が得られたり文献に記載がある場合は、試験を実行できる可能性がある。

5. 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。これは、Keap1-Nrf2-ARE 経路の活性化をもたらす主要な機序は、ストレッサーと Keap-1 の求核性チオール（システインのスルフヒドリル基）との求電子反応であると考えられるためである。この不確実性に対処するには、特にシステインとリジンの反応性を識別できるアッセイの場合、ペプチド結合性試験から得られる相補的情報が役立つ場合がある。さらに、使用する細胞株の代謝能力が限定的である（12）ために、また、本試験法の実験条件のために、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。しかし、プレハプテン（すなわち、自動酸化によって活性化される化学物質）およびプロハプテン（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）の多くは、AOP の第一から第三のキーイベントを対象とする試験法の組み合わせによって十分に特定されているため、一般に、陰性結果を分類の裏付けに用いることができる（13）（14）（15）。一方、感作物質としての作用はないが、化学的ストレッサーとして作用する被験物質は、VRM で示されているとおり、偽陽性結果をもたらすことがある（11）。最後に、ルシフェラーゼ酵素反応に干渉する被験物質は、細胞に基づくアッセイにおけるルシフェラーゼ活性に影響を及ぼし、見かけ上阻害が亢進のいずれかをもたらすことがある（16）。例えば、1  $\mu\text{M}$  を超える濃度の植物性エストロゲンは、他のルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにおいて、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の過剰活性化を介して発光シグナルに干渉することが報告されている（17）。そのため、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と同様にルシフェラーゼレポーター遺伝子過剰活性化を招くことが疑われる類似物質の存在下で得られたルシフェラーゼの発現は、注意深く検討する必要がある（17）。他の特定のカテゴリーに属す化学物質に LuSens 試験法が適用できない証拠が示され得る場合、本試験法は、そのようなカテゴリーに用いるべきではない。

6. 皮膚感作性物質（すなわち UN GHS 区分 1）と非感作性物質を識別するのに加え、LuSens 試験法は、VRM に関して述べたように、IATA などの統合的アプローチの中で用いられて感作性の強度評価に寄与し得る情報（例えば用量反応関係）も提示する（13）。しかし、LuSens 試験法の結果が強度評価にどのように寄与し得るかを判断するには、特に IATA との関わりにおいてさらなる研究が必要であり、またそれはヒトのデータに基づくことが望ましい（18）。角化細胞株レポーターアッセイ試験法を他の情報と組み合わせて使用する方法的例が文献として報告されている（15）（18）。

7. 定義については「概要」の補遺 1 に示されている。

## 試験の概要



8. LuSens 試験法には、ラット NQO1 遺伝子の抗酸化剤応答配列 (ARE) の調節下にあるルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定的に導入した、ヒト角化細胞由来の不老化した接着細胞株を使用する (20)。NQO1 のように ARE に依存する遺伝子は、接触感作性物質によってアップレギュレートされることが知られている (21) (22)。この細胞株は、ARE エLEMENTと融合したプロモーターの転写制御下にあるルシフェラーゼ遺伝子を含む (7)。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、この遺伝子組換え細胞株におけるルシフェラーゼシグナルの Nrf2 依存性が、VRM で直接的に (23)、そして LuSens 法で間接的に (7) 実証されている。したがって、求電子性の被験物質に細胞を曝露した後、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を (発光検出によって) 定量的に測定することで、これを Nrf2 転写因子活性化の指標とすることができる。
9. LuSens 試験法では、被験物質が、細胞生存率に有意な影響を及ぼさない (すなわち、細胞生存率が 70%超となる) 連続した 2 段階以上の濃度において、所定の閾値を超える (すなわち、1.5 倍以上または 50%以上の上昇) 統計的に有意なルシフェラーゼ活性を誘導する場合、その被験物質は陽性と判定される (7) (8)。そのために、溶剤/溶媒対照との比較によって、ルシフェラーゼ活性の誘導を測定する。さらに、ルシフェラーゼ活性の誘導レベルが細胞毒性に達しない濃度で生じるかどうかを評価するため、並行して細胞毒性を測定する。
10. 本試験ガイドラインを厳守した LuSens 試験法を日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、この付録の補遺 1 に収載された習熟度評価用物質 10 種を用いて技術的習熟度を立証する。

## 試験の手順

11. LuSens 試験法については EURL ECVAM の動物実験代替法データベースサービス (Database on Alternative Methods to Animal Experimentation : DB-ALM) プロトコルが利用可能であり、本試験法を実験施設内で実施・使用する際にはこのプロトコルを採用すべきである (24)。LuSens 試験法の主なプロトコルの各ステップを VRM と比較した概要を、この付録の補遺 2 に示す。本試験ガイドラインを履行する施設は、試験開発元に要請することによって、本試験法に使用する組換え細胞株を入手できる<sup>3</sup>。ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイは、プロメガ (Promega) 社との限定使用ライセンスを課されており、i) プロメガ社から購入した発光測定アッセイ用試薬の使用、または ii) 商業利用フリーライセンスを取得するためのプロメガ社への連絡、のいずれかが必要である。LuSens 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

12. 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、LuSens 組換え細胞株を使用すること。細胞は、入手次第、試験法プロトコルに従って増殖させ (例：1～3 回の継代)、均一なストックの状態で冷凍保存する。このオリジナルストックから起こした細胞は、継代回数が最大 20 回となるまで増殖可能であり、試験法のプロトコル (24) に記載の方法に従って、適切な維持/増殖用培地 (例：血清および抗生物質 (選択用の維持培地にはピューロマイシン、コンタミ防止のためにはペニシリン/ストレプトマイシン) を含有する Dulbecco 改変イーグル培地：DMEM) を用いた日常的な試験に用いられる。ただし、試験実施時の培地には抗生物質を添加しない。

<sup>3</sup> BASF 社、67056 ルートヴィヒスハーフェン、ドイツ

13. 試験に際しては、細胞は 80～90%コンフルエントとし、完全なコンフルエントにまで増殖させないように留意する。試験前日に細胞を回収し、適切な細胞密度（すなわち、10,000 cells/ウェル）となるように 96 ウェルプレートに播種する。すべてのウェルで細胞数の分布が確実に均一となるよう、播種作業中に細胞が沈降しないよう注意が必要である。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。被験物質の各濃度での主たるルシフェラーゼ試験の繰り返し試行毎に、ルシフェラーゼ活性測定用として 3 回の反復を実施し、細胞生存率測定用として 3 回の反復を実施する。

### 被験物質および対照物質の調製

14. 被験物質および対照物質は、試験当日に調製（または、安定な凍結溶液の場合はその解凍）する。被験物質は、例えばジメチルスルホキシド（DMSO、CAS 番号 67-68-5、純度 99%以上）などの適切な溶剤に、最終濃度が検討する最大濃度（例：200 mM）に達するように溶解する。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地に溶解し、適切な手段によって最終的な溶液を無菌の状態とする。分子量（MW）が不明の被験物質の場合、ストック溶液を初期設定濃度（200 mg/mL または 20% (w/v)）に調製する。DMSO 以外の溶媒、水、または培地を用いる場合には、十分な科学的根拠を提示する。

15. DMSO、または DMSO に不溶の場合は滅菌水または培地を用いて、被験物質のストック溶液を段階希釈し、主要濃度のサンプルを得る（例：0.098～200 mM の範囲で 12 段階の濃度）。用いる溶剤に関わらず、次に上記主要濃度のサンプルを血清含有培地でさらに 25 倍希釈し、最終的な処理にはこれをさらに 4 倍に希釈して用いるため、被験物質は最終濃度に到達する（例：希釈倍率 2 の段階希釈に基づき 0.98～2,000  $\mu$ M とする）。分子量が不明の被験物質の場合、DMSO または適切な溶剤を用いて段階希釈を行い、希望する最終濃度（例えば、0.98～2,000  $\mu$ g/mL）の被験物質溶液を得る。

16. 最初に、細胞毒性に関する用量設定試験を、例えば濃い方の濃度について実施し、細胞生存率が 75%まで低下する濃度（CV<sub>75</sub>）をあらかじめ測定する。この CV<sub>75</sub>を濃度決定の基準として用いて、主たるルシフェラーゼ試験およびそれと並行する細胞毒性試験を実施する（例：希釈倍率 1.2 の CV<sub>75</sub>より高い 1 濃度、CV<sub>75</sub>ちょうど、CV<sub>75</sub>より低い 4 濃度を、希釈倍率 1.2 の段階希釈、すなわち CV<sub>75</sub>/2.07、CV<sub>75</sub>/1.73、CV<sub>75</sub>/1.44、CV<sub>75</sub>/1.2、CV<sub>75</sub>、および CV<sub>75</sub> x 1.2  $\mu$ M として調製する）。正当な根拠（例えば、細胞毒性が低すぎる場合や高すぎる場合、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（24）。

17. 同時に、溶剤／溶媒対照（例：DMSO）も繰り返し試行毎に試験を実施すべきであり、その際は各プレートに十分な数の対照ウェルを設定する（例：プロトコール（24）に記載の通り、細胞毒性に関する用量設定試験では 12 ウェル、主たるルシフェラーゼ試験では 24 ウェル）。溶剤／溶媒対照では、主要濃度について段落 15 の記載と同じ希釈を行うため、最終的な溶剤／溶媒対照の濃度は被験物質および陽性対照における濃度と同じとすべきであり（すなわち、1%）、また、細胞生存率に有意な影響を及ぼしてはならない。使用する溶剤（例：DMSO）に不溶のために水で希釈した被験物質の場合、最終的な試験溶液のウェルすべてにおいて、その被験物質の溶剤濃度は他の被験物質および対照物質の場合と同じ溶剤濃度（すなわち、1%）となるように調整しなければならない。

18. 同時に、陰性対照も繰り返し試行毎に試験を実施すべきであり、その際は各プレートに十分な数の対照ウェルを設定する（例：プロトコール（24）に記載の通り、細胞毒性に関する用量設定試験では 3 ウェル、主たるルシフェラーゼ試験では 6 ウェル）。LuSens 試験法において、同時に試験する陰性対照は

5,000  $\mu\text{M}$ （または 450  $\mu\text{g/mL}$ ）の DL-乳酸（CAS 番号 50-21-5、純度 99%以上）である。これは非感作性物質であり、また、LuSens 試験法において陰性の予測が得られることが知られている。これ以外の適切な陰性対照は、既存データが入手可能で同程度の実行許容基準を得られれば、用いることができる。さらに、LuSens 試験法では、十分な数のウェル（例：プロトコル（24）に記載の通り、細胞毒性の用量設定試験では 6 ウェル、主たるルシフェラーゼ試験では 12 ウェル）において、未処理の細胞と培地のみを含むブランクの培地対照を設定する。

19. 同時に、陽性対照も、試験系が適切に反応していることを実証するために、繰り返し試行毎に十分な数のウェルにおいて試験を実施すべきである（例：プロトコルに記載の通り、細胞毒性に関する用量設定試験では 2 ウェル、主たるルシフェラーゼ試験では 5 ウェル（24））。LuSens 試験法の場合、陽性対照には 120  $\mu\text{M}$  のジメタクリル酸エチレングリコール（EGDMA、CAS 番号 97-90-5、純度 99%以上）を用いる。陽性対照は、段落 14 で主要濃度に関して記載されている方法、および本試験法プロトコル（24）に記載の方法と同一の希釈ステップを用いて調製する。例えば、実施施設の設備が新しい、または EGDMA のバッチが新しいなどの理由で、濃度 120  $\mu\text{M}$  の陽性対照の細胞毒性が強すぎる、またはルシフェラーゼを 2.5 倍以上に誘導できない（段落 31 参照）場合は、実施施設は、EGDMA を用いて用量設定試験を実施し、溶剤／溶媒対照と比較したルシフェラーゼ誘導倍率が 2.5 以上で細胞生存率が 70%以上となる濃度を設定する（この濃度はさらに 2 回以上試験を繰り返して確認すること）。また、これ以外に、ほぼ中央の濃度範囲で  $\text{EC}_{1.5}$  値を示す適切な陽性対照は、同等の実行許容基準を満たす歴史的データが得られる場合は利用できる。

### 被験物質および対照物質の適用

20. 被験物質、予測（陽性または陰性）を得るための実験 1 セットが必要である。1 セットの実験は少なくとも 2 回の独立した繰り返し試行からなり、1 試行は 3 回の反復測定を含む（すなわち、1 セットの実験で  $n = 6$  回）。独立した 2 回の繰り返し試行間で結果が一致しない場合、3 回の反復測定からなる 3 回目の繰り返し試行を実施する（すなわち、 $n = 9$  回）。独立した繰り返し試行は、新たに調製した被験物質ストック溶液および別に回収した細胞を用いて、別の日に実施する。ただし、細胞の継代回数は同じでもよい。

21. 細胞は段落 13 に記載のように播種した後、96 ウェルプレートで 24 時間培養する。次いで、培地を除去して新たな培地（本試験法プロトコル（24）に記載の通り、血清含有、抗生物質不含の DMEM 150  $\mu\text{L}$ ）と交換し、ここに 25 倍希釈した被験物質および対照物質 50  $\mu\text{L}$  を添加する。バックグラウンド値を評価するため、1 プレートあたり少なくとも 1 ウェルは空のまま（無細胞かつ無処置）とする。

22. 次に、この処理プレートを 5%  $\text{CO}_2$  存在下、 $37\pm 1^\circ\text{C}$  で約 48 時間インキュベートする。被験物質を加えてのインキュベーションの間、揮発性の被験物質の蒸発や、ウェル間の被験物質による交差汚染を予防する目的で、例えばプレートをアルミホイルで被覆するなどして注意を払う必要がある。

### ルシフェラーゼ活性の測定

23. 適切な発光測定値を保証するには、以下の要因が極めて重要である。

- 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、十分な発光力を有するルシフェラーゼ基質の使用
- 適切で安定なバックグラウンドレベル

試験に先立ち、この付録の補遺 3 に記載の通り品質管理実験を実施し、この 3 つの要因が満たされていることを確認する。

24. 48 時間にわたって被験物質および対照物質に曝露した後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、発光測定のための適切な細胞溶解用緩衝液を各ウェルに添加し、十分な時間（例：暗所で 5～10 分間）静置する。

25. 細胞溶解物を含むプレートを、本試験法プロトコール（24）に記載のプログラムを設定したルミノメーターにセットして測定を行う。他の設定を用いる場合には（使用するルミノメーターの機種の違いなど）、その正当性を証明すること。さらに、この付録の補遺 3 の品質管理実験を実施して要件が満たされている場合は、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

26. LuSens 細胞の生存率の測定では、48 時間の曝露の終了後、培地を 0.5 mg/mL の 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% CO<sub>2</sub> 存在下、37±1°C で 2 時間インキュベートする。次に、この MTT 培地を除去し、適切な細胞溶解試薬を使用し、十分な時間をかけて細胞を溶解する（例：10%(w/v) SDS および 0.4%(v/v)酢酸を含む DMSO 溶液を加えて 5 分間）。振盪後、本試験法のプロトコール（24）に記載のパラメータを用いて吸光度を測定する。

## データおよび報告

### データの評価

27. LuSens 試験法の場合、以下のパラメータを算出する（詳細な数式についてはこの付録の補遺 4 を参照）。

- 被験物質、陽性対照、陰性対照のすべての濃度におけるルシフェラーゼ活性の誘導倍率
- 被験物質およびすべての対照の、すべての濃度における細胞生存率（CV）を求め、細胞生存率が 75%となる濃度値（CV<sub>75</sub>）を（補間によって）算出

28. ルシフェラーゼ活性の誘導倍率が 1.5 以上（ $\geq$ ）となる各濃度について、3 回の反復サンプルにおける発光測定値と溶剤／溶媒対照のウェルにおける発光測定値とを比較することによって、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）判定し、ルシフェラーゼ活性の誘導が統計的に有意（ $p < 0.05$ ）であるかどうかを評価する。さらに、これらの濃度において、有意な細胞毒性作用が生じていないこと（すなわち、ルシフェラーゼ誘導倍率が 1.5 倍以上である濃度において細胞生存率が 70%以上であること）を確認する。

29. 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、これが被験物質に特異的な結果なのか、実験のアーティファクトに起因するのかを検証する。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、低い方の濃度（閾値 1.5 に最初に交差する場合の濃度）を報告すること。しかし、 $EC_{1.5}$  をもたらす濃度は必要条件ではない。

30. LuSens 試験法において、ルシフェラーゼ誘導倍率が 1.5 以上となる濃度が、もっとも低い試験濃度（例： $CV_{75}/2.07$ ）であった場合、少なくとももう 1 段階さらに低い濃度で再試験を実施すること。

### 許容基準

31. LuSens 試験法を用いる場合、以下の許容基準を満たすこと。以下の許容基準のいずれかが満たされていない場合は、そのデータは採用せず、新たな繰り返し試行を実施すること。

- 陽性対照（120  $\mu\text{M}$  EGDMA、または同等の濃度。段落 19 参照）から得られたルシフェラーゼ活性誘導倍率の平均が 2.5 以上であり、かつ、溶剤／溶媒対照と比較したとき、この陽性対照の相対的な細胞生存率が 70%以上であること。
- 陰性対照（5,000  $\mu\text{M}$  DL-乳酸）から得られたルシフェラーゼ活性誘導倍率の平均、ならびに未処理細胞における基底状態での発現量が、溶剤／溶媒対照の平均と比較して 1.5 倍未満であること。
- 溶剤／溶媒対照（例：DMSO）の発光測定値について、その変動係数の平均値が、各繰り返し試行において 20%未満であること。
- 少なくとも 3 段階の試験濃度において、溶剤／溶媒対照に対する相対細胞生存率が 70%以上であること。さらに、結果が陰性と考えられる場合は、少なくとも 1 段階の濃度で細胞毒性が認められる（すなわち、細胞生存率が 70%未満である）か、または最大濃度である 2,000  $\mu\text{M}$ （または分子量不明の被験物質の場合は 2,000  $\mu\text{g/mL}$ ）について試験が行われていること。

32. 場合によっては、被験物質が細胞毒性を誘導しないことがあり、そのような場合は最大の試験濃度を 2,000  $\mu\text{M}$ （または分子量不明の被験物質の場合は 2,000  $\mu\text{g/mL}$ ）としなければならない。主たるルシフェラーゼ試験において、どの濃度でも細胞毒性が認められない、すなわち細胞生存率が 70%未満にならず、かつルシフェラーゼの誘導が起らない場合は、主たるルシフェラーゼ試験で使用した 1.2 倍ずつの段階希釈に代えて、 $CV_{75}$ を基本とした 1.44 倍ずつの段階希釈（すなわち、 $1.44 \times CV_{75}$  からスタートする）を用いて、第 2 の繰り返し試行を実施すること。この第 2 の繰り返し試行においても細胞毒性およびルシフェラーゼ誘導が認められない場合は、最大濃度である 2,000  $\mu\text{M}$ （または分子量不明の被験物質の場合は 2,000  $\mu\text{g/mL}$ ）で第 3 の繰り返し試行を実施すること。この繰り返し試行は、第 4 の繰り返し試行を実施して確認する必要がある。

### 結果の解釈および予測モデル

33. LuSens による予測では、2 回の繰り返し試行のうち 2 回とも、または 3 回の繰り返し試行のうち 2 回において、以下の条件を満たす場合に陽性とみなし、それ以外の場合、LuSens による予測では陰性とみなす（図 1）。

- 連続した 2 段階以上の非細胞毒性濃度（すなわち細胞生存率が 70%以上（ $\geq$ ）である）において、ルシフェラーゼ活性誘導が 1.5 倍以上（ $\geq$ ）であって、そのことが溶剤対照と比較して統計的に有意であり、さらに、検討した濃度のうち少なくとも 3 段階で細胞毒性がない（細胞生

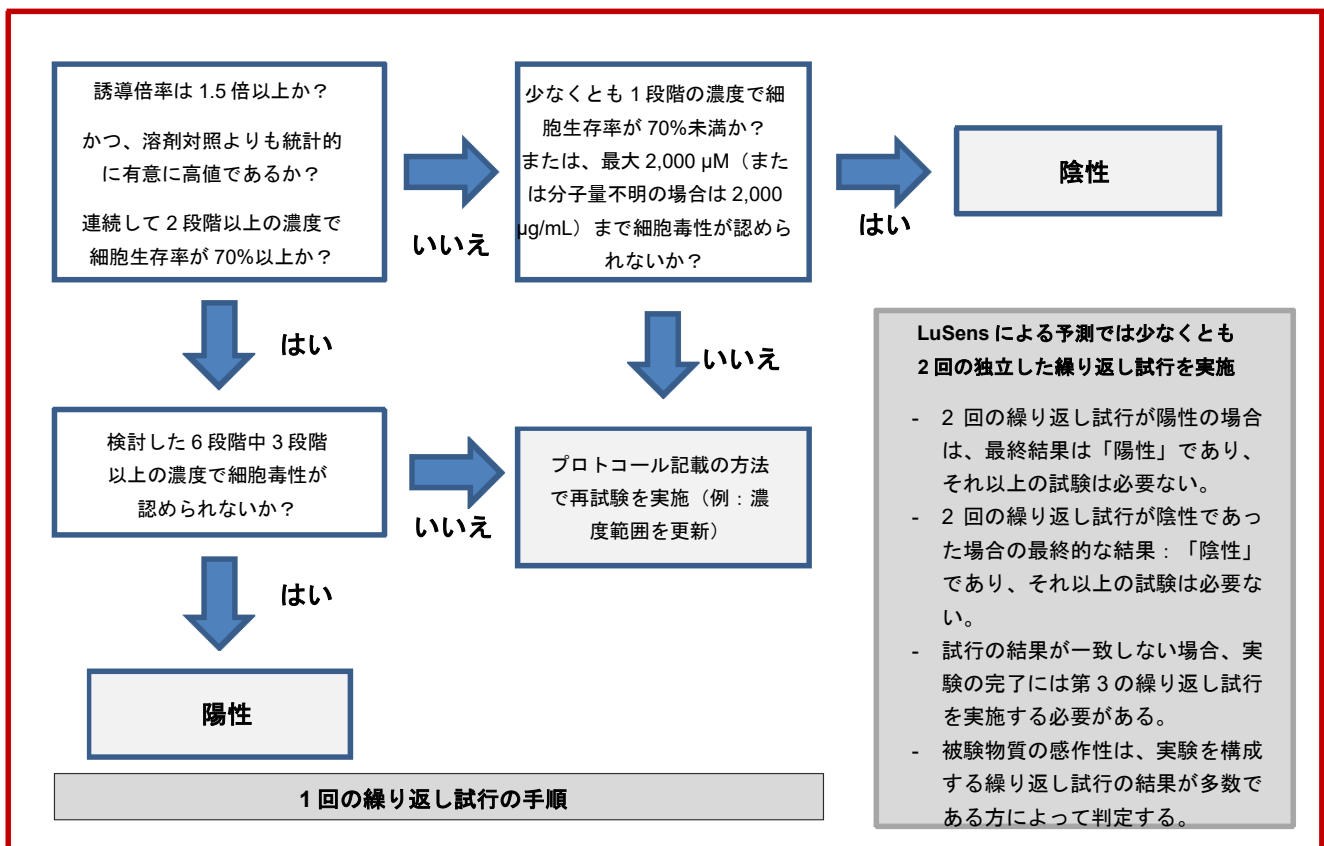


存率が 70%以上（ $\geq$ ）である）こと。

34. 加えて、被験物質が安定な分散液を形成せず、最大濃度である 2,000  $\mu\text{M}$  未満（または分子量不明の被験物質の場合 2,000  $\mu\text{g/mL}$  未満）における試験を行わなかった場合、また検討したいずれの濃度においても細胞毒性が認められなかった場合（段落 31 参照）に得られた陰性結果も、結論が得られないとみなす（段落 4 参照）。

図 1. LuSens 試験法における予測のための基準の概要。

LuSens による予測は、確定方式または IATA の枠組みの中で、また、本ガイドラインの「概要」の段落 4、ならびに段落 7 および段落 8 の条項に従って検討すること。



## 試験報告書

35. 試験報告書には、以下の情報を含めること。

### 被験物質

- 単一成分物質
  - IUPAC または CAS 名称、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはその他の識別子（バッチ／ロット番号および有効期限など）といった化学的識別情報
  - 外観、水への溶解度、DMSO への溶解度、分子量、および入手可能なその他の関連する物

## 理化学的特性

- 曝露用培地における溶解度または安定な分散液に関する記述
- 純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的識別情報など
- 該当する場合は、試験の前処理（加温、粉碎など）
- 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：
  - 成分の化学的識別情報（上記参照）、純度、定量的組成、ならびに関連のある物理化学的特性（上記参照）などによる可能な限りの特徴付け
  - 外観、水への溶解度、DMSO への溶解度、および入手可能なその他の関連する物理化学的特性
  - 曝露用培地における溶解度または安定な分散液の記述
  - 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
  - 該当する場合は、試験の前処理（加温、粉碎など）
  - 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
  - IUPAC または CAS 名称、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはその他の識別子などの化学的識別情報
  - 外観、水への溶解度、DMSO への溶解度、分子量、および入手可能かつ適用可能なその他の関連する物理化学的特性
  - 純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的識別情報など
  - 該当する場合は、試験の前処理（加温、粉碎など）
  - 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、適切な実効許容基準であることを示した既存陽性対照結果の歴史的データ
- 溶剤／溶媒対照

- IUPAC または CAS 名、CAS 番号、および／またはその他の識別子などの化学的識別情報
- 純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的識別情報など
- この付録に記載以外の溶剤／溶媒を用いる場合、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状
- 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剤／溶媒選択の妥当性
- 陰性対照
  - IUPAC または CAS 名、CAS 番号、および／またはその他の識別子などの化学的識別情報
  - 純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的識別情報など
  - この付録に記載されたもの以外の陰性対照を用いる場合、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状
  - 入手可能な範囲の保存条件および安定性
  - 本試験ガイドラインに記載以外の陰性対照を使用する場合、その陰性対照選定の妥当性

### 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所在地
- 使用する試験法の説明
- 使用する細胞株、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分布を確保するために行われた措置（段落 13 参照）
- 使用したルミノメーター（例えば機種）および機器の設定内容、使用したルシフェラーゼ基質、ならびにこの付録の補遺 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、または本試験法の長期的な再現性の性能を立証するのに用いた手順

### 試験手順

- 繰り返し試行数および反復測定数
- 使用した被験物質の濃度、適用手順、および曝露時間（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

- 各繰り返し試行において、被験物質および陽性対照について得られたルシフェラーゼ活性誘導倍率および細胞生存率（LuSens 試験法の場合は CV<sub>75</sub>）の値の一覧表
- すべての各繰り返し試行のデータを用いて算出した平均値（すなわち、細胞生存率およびルシフェラーゼ活性誘導倍率の算術平均）、および標準偏差
- 予測モデルに従って得られた被験物質の評価の提示
- 実験ごとに溶剤／溶媒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観察結果の記述

### 結果の考察

- LuSens 試験法により得られた結果の考察
- 他の関連情報が入手可能な場合、IATA の範囲内における本試験法の結果の考察

### 結論

## 参考文献

- 1) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1, 45-49.
- 6) OECD (2015). Guidance Document No 213. Performance Standards for assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. Series on Testing and Assessment. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- 7) Ramirez T., Mehling A., Kolle S.N., Wruck C.J., Teubner W., Eltze T., Aumann A., Urbisch D., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2014). LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. *Toxicol. In Vitro* 28, 1482-1497.
- 8) Ramirez T., Stein N., Aumann A., Remus T., Edwards A., Norman K.G., Ryan C., Bader J.E., Fehr M., Burleson F., Foertsch L., Wang X., Gerberick F., Beilstein P., Hoffmann S., Mehling A., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2016). Intra- and inter-laboratory reproducibility and accuracy of the LuSens assay: A reporter gene-cell line to detect keratinocyte activation by skin sensitizers. *Toxicol. In Vitro* 32, 278-286.
- 9) EURL ECVAM (2018). The LuSens test method Validation Study Report. Accessible at: <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2011-10>
- 10) ESAC (2016). ESAC opinion on the BASF-coordinated Performance Standards-based validation of the LuSens test method for skin sensitisation testing. Available at: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC103706/esac\\_opinion\\_2016-04\\_lusens\\_final.pdf](http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC103706/esac_opinion_2016-04_lusens_final.pdf).
- 11) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ 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](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation).
- 12) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle 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, 1683-1699.
- 13) 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.
- 14) Casati S., Aschberger K., Asturiol D., Basketter D., Dimitrov S., Dumont C., Karlberg A.T., Lepoittevin J.P., Patlewicz G., Roberts D.W., Worth A. (2016). Ability of non-animal methods for skin sensitisation to detect pre- and pro-haptens: Report and recommendations of an EURL ECVAM expert meeting.



EUR 27752 EN. Available at : <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-status-reports/pre-prohaptan-workshop-report>.

- 15) Bauch C., Kolle 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.
- 16) Thome 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.
- 17) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 18) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
- 19) Urbisch D., Becker M., Honarvar N., Kolle S.N., Mehling A., Teubner W., Wareing B., Landsiedel R. (2016). Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Non-animal Test Methods for Skin Sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* 29, 901-13.
- 20) Wasserman W.W., Fahl W.E. (1997). Comprehensive analysis of proteins which interact with the antioxidant responsive element: correlation of ARE-BP-1 with the chemoprotective induction response. *Arch. Biochem. Biophys.* 344, 387-396.
- 21) Ade N, Leon F, Pallardy M, Peiffer JL, Kerdine-Romer S, Tissier MH, Bonnet PA, Fabre I, Ourlin JC.(2009); HMOX1 and NQO1 genes are upregulated in response to contact sensitizers in dendritic cells and THP-1 cell line: role of the Keap1/Nrf2 pathway. *Toxicol Sci.* 2009 Feb;107(2):451-60.
- 22) Rob J. Vandebriel, Jeroen L. A. Pennings, Kirsten A. Baken, Tessa E. Pronk, Andre Boorsma, Ralph Gottschalk, Henk Van Loveren; Keratinocyte Gene Expression Profiles Discriminate Sensitizing and Irritating Compounds, *Toxicological Sciences*, Volume 117, Issue 1, 1 September 2010, Pages 81–89, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq182>
- 23) 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.
- 24) DB-ALM Protocol No. 184 (2017). LuSens Assay. Available at <https://ecvam-dbal.m.jrc.ec.europa.eu>
- 25) 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.
- 26) Basketter D.A., Alépée N., Ashikaga T., Barroso J., Gilmour N., Goebel C., Hibatallah J., Hoffmann S., Kern P., Martinozzi-Teissier S., Maxwell G., Reisinger K., Sakaguchi H., Schepky A., Tailhardat M., Templier M. (2014). Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatitis* 25, 11-21.



## 付録 IB—補遺 1：習熟度評価用の物質

## In vitro 皮膚感作性：角化細胞株レポーターアッセイ LuSens 試験法

試験ガイドライン 442D のこの付録を厳守した試験法を日常的に用いるのに先立ち、表 1 において推奨される習熟度評価用の 10 物質について、期待される予測結果を正確に取得し、また、習熟度評価用の 10 物質のうち 8 物質以上について、それぞれの基準範囲内に含まれる値を取得することによって、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、皮膚感作性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 LuSens 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：LuSens 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 形状	LLNA における 予測 (1)	ヒトに関 する区分 (2)	LuSens		
					In Vitro 予測 (3)	EC <sub>1.5</sub> (μM) の基準範 囲 (4)	CV <sub>75</sub> (μM) の基準範囲 (4)
サリチル酸	69-72-7	固体	非感作性物質	区分 6	陰性	> 1000	> 2000
グリセロール	56-81-5	液体	非感作性物質	区分 6	陰性	> 1000	> 2000
イソプロパノール	67-63-0	液体	非感作性物質	区分 5	陰性	> 1000	> 2000
スルファニルアミド	63-74-1	固体	非感作性物質	陰性 (Baskett er et al. 1994)	陰性	> 1000	> 2000
オイゲノール	97-53-0	液体	感作性物質 (弱い [weak] )	区分 3	陽性	< 500	< 1000
シンナミルアルコール	104-54-1	固体	感作性物質 (弱い [weak] )	区分 3	陽性	< 170	> 420
2-メルカプトベンゾチアゾール	149-30-4	固体	感作性物質 (中等度 [moderate] )	区分 3	陽性	< 800	< 2000
4- (メチルアミノ)	55-55-0	固体	感作性物質	区分 3	陽性	< 30	< 50

フェノール硫酸塩			(強い [strong] )				
メチルジブromogル タロニトリル	35691- 65-7	固体	感作性物質 (強い [strong] )	区分 2	陽性	< 25	< 50
2,4-ジニトロクロロ ベンゼン	97-00-7	固体	感作性物質 (非常に強い [extreme] )	区分 1	陽性	< 5	< 10

注：(1) *in vivo* における危険有害性（および強度）の予測結果は、LLNA データに基づく [25]。*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）[18]により提唱された基準を用いて得られている。

(2) Basketter らによる [26]。区分 1 は「接触アレルギーの明確な証拠を有する」、区分 2 は「しばしば接触アレルギーの原因となる」、区分 3 は「接触アレルギーの一般的な原因である」、区分 4 は「時折接触アレルギーの原因となる」、区分 5 は「まれに接触アレルギーの原因となる」、そして区分 6 は「接触アレルギーの証拠を本質的に欠く」を表す。

(3) 角化細胞株レポーターアッセイによる予測は、確定方式または IATA の枠組みの中で、また、本ガイドラインの「概要」の段落 7 および段落 8 の条項に従って検討すること。

(4) 過去に測定された値に基づく [7] [8]。EC<sub>1.5</sub> は LuSens による予測モデルには含まれていないが、取得されるデータから算出可能であり、習熟度評価用物質に関する LuSens の反応の範囲を決定する目的で利用できる。EC<sub>1.5</sub> 値は付録 IA（段落 26）に従って算出した。

## 付録 IB—補遺 2：LuSens 試験法と VRM である KeratinoSens™ 試験法のプロトコールにおける主要ステップの比較

	VRM (KeratinoSens™)	LuSens
<i>角化細胞培養液の調製</i>		
増殖	2～4 代	1～3 代
凍結保存	2～4 代	3 代
主たる実験の前の細胞継代数	2 代以上	5 代以上
凍結ストックから培養可能な最大継代数	25 代	細胞毒性に関する用量設定試験では 20 代 主たるルシフェラーゼ試験では 15 代
増殖培地	血清およびジェネティシンを含む DMEM	血清、ペニシリン/ストレプトマイシン、およびピユーロマイシンを含む DMEM
試験の際の細胞のコンフルエントの状態		80-90%
試験前の細胞の回収		1 日
試験に使用するプレートの形式		96 ウェルプレート
試験の際に播種する細胞数	10,000 cells/ウェル (バックグラウンド測定用のウェルを除く)	
被験物質の濃度ごとの反復測定数 (各繰り返し試行において)	ルシフェラーゼ活性測定では 3 ウェル (独立したプレート) 細胞毒性評価では 1 ウェル	すべての試験、すなわち細胞毒性に関する用量設定試験および主たるルシフェラーゼ試験で 3 ウェル (同一のプレート) (ルシフェラーゼ測定用で 3 ウェル、並行して実施する細胞毒性評価で 3 ウェル)
<i>被験物質および対照物質の調製</i>		
調製		試験当日
溶剤	DMSO、滅菌水または培地 (DMSO に不溶の被験物質の場合)	DMSO、または培地 (DMSO に不溶の被験物質の場合)
ストック溶液濃度		200 mM
分子量不明の被験物質	所定の濃度 (40 mg/mL または 4%(w/v)) でストック溶液を調製	所定の濃度 (200 mg/mL または 20%(w/v)) でストック溶液を調製
96 ウェルプレートにおける最終的な試験濃度の範囲	0.98～2,000 $\mu$ M の 12 段階の濃度 (希釈倍率は 2)	細胞毒性に関する用量設定試験： 0.98～2,000 $\mu$ M の 12 段階の濃度 (希釈倍率は 2)  主たるルシフェラーゼ試験： CV <sub>75</sub> /2.074～CV <sub>75</sub> x 1.2 $\mu$ M の 6 段階の濃度 (希釈倍率は 1.2)
溶剤対照	1% DMSO (繰り返し試行毎に 18 件の反復測定)	1% DMSO (細胞毒性に関する用量設定試験では繰り返し試行毎に 12 件、主たるルシフェラーゼ試験では繰り返し試行毎に 24 件の反復測定)
陰性対照	溶剤対照を参照	5,000 $\mu$ M の DL-乳酸 (細胞毒性に関する用量設定試験では繰り返し試行毎に 3 件、主たるルシフェラーゼ試験では繰り返し試行毎に 6 件の反復測定)

陽性対照	シンナムアルデヒド 4~64 µM の 4 段階の濃度（希釈倍率は 2） （繰り返し試行毎に 3 件の反復測定）	120 M の EGDMA または、ルシフェラーゼ誘導倍率が 2.5、細胞生存率が 70%以上となるようなその他の濃度 （細胞毒性に関する用量設定試験では繰り返し試行毎に 2 件、主たるルシフェラーゼ試験では繰り返し試行毎に 5 件の反復測定）
培地対照	適用なし	細胞毒性に関する用量設定試験では繰り返し試行毎に 6 件、主たるルシフェラーゼ試験では繰り返し試行毎に 12 件の反復測定
ブランク対照（細胞なし）	繰り返し試行毎に 3 件の反復測定	繰り返し試行毎に 1 件の反復測定
被験物質および対照物質の適用および評価するエンドポイント		
被験物質の濃度ごとの繰り返し試行数	それぞれ 3 回の反復測定を含む独立した繰り返し試行を少なくとも 2 回実施し（n=6）、結果が一致しない場合は 3 回目の繰り返し試行を実施する（n=9）。 繰り返し試行はそれぞれ別の日に、新たに調整した被験物質および独立して回収した細胞を用いて実施する（継代数は最終的に同一である）。	
細胞処理用の培地	血清を含み、抗生物質（ジェネティシン、ペニシリン/ストレプトマイシン、およびピユーロマイシン）を含まない DMEM 培地 150 µL ここに 25 倍希釈した被験物質および対照物質 50 µL を加える	
曝露時間	5% CO <sub>2</sub> 存在下、37±1°C で 48 時間 揮発性の被験物質の蒸発、およびウェル間の交差汚染を防ぐため、プレートはアルミホイルで覆う。	
発光活性の測定	曝露後の細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、発光測定のための適切な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。 細胞溶解物を含むプレートを、以下のプログラムを設定したルミノメーターにセットして測定を行う。すなわち、 i) 各ウェルにルシフェラーゼ基質を添加する。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。	曝露終了後、発光測定のための適切な細胞溶解用緩衝液を各ウェルに添加し、暗所で 5~10 分間震盪する。 ルミノメーターを用いて 2 秒間の発光を測定する。 使用するルミノメーターによってはその他の条件が適用されることがある。
細胞毒性の評価	曝露終了後、細胞に 5 mg/mL の MTT 溶液を加え、5% CO <sub>2</sub> 存在下、37±1°C で 4 時間インキュベートする その後、一晩かけて細胞を溶解し（10% SDS 溶液を使用）、震盪してから 600 nm における吸光度を測定する	曝露終了後、細胞に 200 µL の MTT 溶液（0.5 mg/mL）を加え、5% CO <sub>2</sub> 存在下、37±1°C で 2 時間インキュベートする 細胞を 5 分間の処理で溶解し（10%(w/v) SDS および 0.4%(v/v) 酢酸の DMSO 溶液を使用）、570 nm および 690 nm における吸光度を測定する
評価するエンドポイント	$I_{\max}$ ：検討した任意の濃度において認められた最大誘導倍率の平均値 EC <sub>1.5</sub> ：ルシフェラーゼ活性の誘導倍率が 1.5 となる濃度を補間によって求めたもの IC <sub>50</sub> / IC <sub>30</sub> ：それぞれ、細胞生存率が 50%減少、30%減少する濃度を補間によって求めたもの	ルシフェラーゼ誘導倍率は、検討したそれぞれの濃度における平均値として算出 細胞生存率は、検討したそれぞれの濃度における平均値として算出 CV <sub>75</sub> ：細胞生存率が 75%となる濃度を補間によって求めたもの
許容基準		

陽性対照のルシフェラーゼ活性	陽性対照（4～64 $\mu\text{M}$ のシンナムアルデヒド）で検討した濃度のうち少なくとも 1 段階において、1.5 倍を超える統計的に有意な誘導  陽性対照の $\text{EC}_{1.5}$ は、歴史的データの平均から 2SD の範囲内（例：バリデーション用データセットで 2～30 $\mu\text{M}$ ）にあること  64 $\mu\text{M}$ のシンナムアルデヒドの平均誘導倍率は 2 から 8 の間であること	非細胞毒性濃度（すなわち、溶剤対照と比較して細胞生存率が 70% 以上）において、溶剤対照と比較した陽性対照（例：120 $\mu\text{M}$ の EGDMA）の活性誘導倍率が 2.5 以上であること
陰性対照のルシフェラーゼ活性	適用なし	溶剤対照と比較した陰性対照（5,000 $\mu\text{M}$ の DL-乳酸）の活性誘導倍率が 1.5 未満であること
溶剤対照の変動	変動係数＝20% （18 件の反復測定）	変動係数＝20% （21 件以上の反復測定）
その他	適用なし	培地対照による基底状態（培地のみを加えた細胞）での平均発現量が、溶剤対照と比較して、ルシフェラーゼの活性誘導倍率として 1.5 未満であること  検討した濃度のうち 3 段階以上（主たるルシフェラーゼ試験では 6 段階中）で細胞毒性が認められないこと（細胞生存率が 70% 以上）さらに、結果が陰性の場合は、少なくとも 1 段階（主たるルシフェラーゼ試験では 6 段階中）の濃度で細胞毒性が認められること（細胞生存率が 70% 未満）
予測モデル		
予測では、2 回の繰り返し試行のうち 2 回とも、または 3 回の繰り返し試行のうち 2 回において、以下の条件を満たす場合に陽性とみなし、それ以外の場合、予測では陰性とみなす	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <math>I_{\text{max}}</math> が 1.5 倍以上（<math>\geq</math>）であり、溶剤対照に対して統計的有意差が認められること（対応のない学生 t 検定）</li> <li>2. ルシフェラーゼ活性の誘導倍率が 1.5 倍以上となる最低濃度（すなわち、<math>\text{EC}_{1.5}</math> の判定濃度）において、細胞生存率が 70% 超（<math>&gt;</math>）であること</li> <li>3. <math>\text{EC}_{1.5}</math> 値が 1,000 <math>\mu\text{M}</math> 未満（<math>&lt;</math>）であること（または、分子量不明の被験物質の場合は 200 <math>\mu\text{g/mL}</math> 未満であること）。</li> <li>4. ルシフェラーゼ誘導に関して、全体に明らかな用量依存的な増加が認められること</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 少なくとも 2 段階の連続した非細胞毒性濃度（すなわち、細胞生存率が 70% 以上（<math>\geq</math>））において、溶剤対照と比較してルシフェラーゼの誘導倍率が 1.5 以上であること</li> <li>2. 検討した濃度のうち 3 段階以上で細胞毒性が認められないこと（細胞生存率が 70% 以上（<math>\geq</math>））</li> </ol>
安定な分散液を形成しない化学物質	1,000 $\mu\text{M}$ 未満（または、分子量不明の被験物質の場合は 200 $\mu\text{g/mL}$ 未満）で安定な分散液を形成しない被験物質について結果が陰性であった場合、結論が得られないとみなす	被験物質が安定な分散液を形成せず、最大濃度である 2,000 $\mu\text{M}$ （または分子量不明の被験物質の場合 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ）における試験を行わなかった場合、結論が得られないとみなす

付録 IB—補遺 3：発光測定値の品質管理

LuSens 試験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

最適な発光測定値を確保するため、アッセイを最初に実施する際は、被験物質として EGDMA の濃度を漸増させたものを用い、また、プレートのレイアウトは下記の通りとして、LuSens 試験法のランを 1 回または 2 回実施することを推奨する。このような繰り返し試行を実施することで、以下の側面を考慮すること。

- ルシフェラーゼの誘導が、処理する EGDMA 濃度の漸増に伴って用量依存的に増加すること（ウェル A～C：1～6）
- ウェル A～D：8～12 の発光測定値と比較して、ウェル D：1～6 および A～D：7（空のウェル）においてルシフェラーゼの用量依存的な増加が認められないこと
- 少なくとも 21 件の溶剤／溶媒対照ウェル（F～G：1～12）におけるばらつきの標準偏差の平均百分率が 20%未満であり、かつ「勾配状の」パターンを示さないこと

表 1：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	EGDMA CV75/2.07	EGDMA CV75/1.73	EGDMA CV75/1.44	EGDMA CV75/1.2	EGDMA CV75	EGDMA CV75 x 1.2						
B	EGDMA CV75/2.07	EGDMA CV75/1.73	EGDMA CV75/1.44	EGDMA CV75/1.2	EGDMA CV75	EGDMA CV75 x 1.2						
C	EGDMA CV75/2.07	EGDMA CV75/1.73	EGDMA CV75/1.44	EGDMA CV75/1.2	EGDMA CV75	EGDMA CV75 x 1.2						
D												
E	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地	培地
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			DL-乳酸、5,000 μM								EGDMA 120 M	ブラン ク



## 付録 IB—補遺 4：LuSens 試験法で用いられる計算

1. LuSens 試験法において、**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、個々の繰り返し試行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

$L_{\text{sample}}$  は、被験物質のウェルにおける発光測定値

$L_{\text{blank}}$  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

$L_{\text{solvent}}$  は、細胞および溶剤対照からなるウェルにおける発光測定値の平均値

2. LuSens 試験法において、**細胞生存率**は式 2 によって算出する。

$$\text{式 2:} \quad \text{生存率} = \frac{(V_{\text{sample}} - V_{\text{blank}})}{(V_{\text{solvent}} - V_{\text{blank}})} \times 100$$

ここで

$V_{\text{sample}}$  は、被験物質のウェルにおける MTT 吸光度の測定値

$V_{\text{blank}}$  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

$V_{\text{solvent}}$  は、細胞および溶剤対照からなるウェルにおける MTT 吸光度測定値の平均値

3. LuSens 試験法において、**細胞生存率が 75%まで低下する濃度（ $CV_{75}$ ）**は、式 3 に従って線形補間により算出し、全体の  $CV_{75}$  は、個々の繰り返し試行の幾何平均値として算出する。

$$\text{式 3:} \quad CV_{75} = (C_b - C_a) \times \left( \frac{75 - V_b}{V_b - V_a} \right) + C_b$$

ここで

$C_a$  は検討した濃度のうち細胞生存率が 75%超となる最高濃度（ $\mu\text{M}$ ）

$C_b$  は検討した濃度のうち細胞生存率が 75%未満となる最低濃度（ $\mu\text{M}$ ）

$V_a$  は濃度  $C_a$  における細胞生存率（%）

$V_b$  は濃度  $C_b$  における細胞生存率（%）

# 付録 IC : *In vitro* 皮膚感作性 : 表皮感作性試験法 ( Epidermal Sensitisation Assay : EpiSensA )

## 最初に考慮すべき事項および限界

1. EpiSensA は、皮膚感作性の有害転帰経路 (AOP) における第二のキーイベント、すなわち、角化細胞活性化 (1) への対処に提唱され、感作性物質に曝露後の再構築ヒト表皮 (RhE) モデルにおいて、角化細胞活性化に関連するマーカー遺伝子発現の変化を定量化する (2) (3)。皮膚感作性の AOP では、角化細胞において、炎症反応と細胞保護に関する遺伝子経路の誘導という 2 つの重要な反応が生じる (2)。活性化転写因子 3 (ATF3) 遺伝子およびインターロイキン 8 (IL-8) 遺伝子の発現は、角化細胞の炎症反応を反映するのに対し、グルタミン酸-システインリガーゼ修飾サブユニット (GCLM) 遺伝子および DnaJ (Hsp40) ホモログサブファミリーB (DNAJB4) 遺伝子の発現は、細胞保護に関する遺伝子経路の誘導を反映する (3)。EpiSensA では、マーカー遺伝子 (すなわち、ATF3、IL-8、GCLM、および DNAJB4) 発現の相対変化を定量的逆転写 PCR (RT-qPCR) により定量後、これらのデータを皮膚感作性物質と非感作性物質との識別の裏付けに用いる。
2. EpiSensA のバリデーション試験実施 (4) 後、日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) と代替試験法協力国際会議 (ICATM) とが、共同で独立したピアレビューを行った (5)。EpiSensA は、危険有害性の特定を目的とした皮膚感作性物質と非感作性物質との識別を裏付けるため、「試験および評価に関する統合的アプローチ (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。
3. EpiSensA において使用される RhE モデルは、LabCyte EPI-MODEL 24 である。EpiSensA は、再構築ヒト表皮 (RhE) モデルにおいて定量的逆転写 PCR を用いて、角化細胞活性化に関連するマーカー遺伝子 (ATF3、IL-8、GCLM、および DNAJB4) 発現の変化を定量化する試験法に関しては、「検証済み標準試験法 (VRM)」であると判断される。これまでと類似または改変した EpiSensA について、バリデーションを促進し、本試験ガイドラインへのタイムリーな改訂内容組み入れを可能にするには、性能基準 (PS) (6) を利用できる。これまでと類似または改変した EpiSensA は、PS 記載の基準がすべて満たされていることを審査し合意した後にのみ、本試験ガイドラインに追加される。それ以外の RhE モデルは、PS に基づくバリデーション試験の実施後に使用できる。
4. EpiSensA は、細胞培養技術の経験がある試験実施施設に移管可能であることが示された (4) (5)

(8) (9) (10)。EpiSensA の施設内再現性は、参加した 2 施設では 93.3% (14/15)、1 施設では 86.7% (13/15) であった。27 種類の被験化学物質の分析について、参加した 3 施設の施設間再現性の算出結果は 88.9% であった (9)。バリデーション試験 (4) および既報の試験 (10) から得られた結果から、LLNA の結果と比較した場合、感作性物質 (すなわち、UN GHS 区分 1) と非感作性物質との識別に関する EpiSensA の正確度は 83.3% (120/144)、感度は 88.8% (95/107)、特異度は 67.6% (25/37) であることが示された。バランス精度は 78.2% である。ヒトでの結果との比較では、EpiSensA の正確度は 80.7% (71/88)、感度は 98.1% (53/54)、特異度は 52.9% (18/34) である。バランス精度は 75.5% である。EpiSensA の偽陰性予測結果を LLNA と比較すると、皮膚感作性の強度が高い化学物質 (すなわち、UN GHS 細区分 1A) よりも、皮膚感作性が低いか中程度の強度の化学物質 (すなわち、UN GHS 細区分 1B) に向いている可能性がより高い (9)。ただし、単独の試験法として EpiSensA に関し示された上記正確度の値は、示唆レベルに留まる。というのは、本試験法で得られた結果は、確定方式 (Defined Approach) または IATA との関連において、また、本試験ガイドライン「概要」の段落 7 および段落 8 の条項に従って (11)、他の出所から得られた情報を併用して検討すべきであるからである。さらに、皮膚感作性の評価に向け、非動物試験法を検討する参考として *in vivo* データを用いる場合、LLNA 試験もそれ以外の動物試験も、ヒトの状況を完全に反映しているわけではないことに留意すべきである。

5. 現在入手可能なデータにより、多様な有機官能基、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、および物理化学的性状を有する被験化学物質に、EpiSensA は適用可能であることが示されている (3) (4) (5) (9) (10)。EpiSensA は、可溶性の化学物質、または適切な溶媒中で安定分散する化学物質の試験に適用可能である (溶媒の選択および被験化学物質の溶解性の評価に関する段落 19 を参照)。さらに、RhE は空気と液体の境界を含む三次元モデルであるため、被験化学物質は RhE モデルの表面に直接適用される。よって、親油性溶媒を使用し、本試験法を親油性化学物質 (例:  $\log K_{ow} > 3.5$ ) の試験に使用することは、いずれも可能である (3) (4) (5) (9) (10)。さらに、プロハプテン (すなわち、皮膚感作性を発揮するには酵素活性化を要すると疑われる化学物質)、およびプレハプテン (すなわち、生物が介入しない変化を介し感作性物質になると想定される化学物質) と推定される多くの物質が、EpiSensA により正しい陽性と評価された (3) (4) (5) (9) (10)。RhE とヒト皮膚の代謝能は、ごく少数の研究において検討されている (12) (13)。これらの研究から、RhE モデルはヒト皮膚と同程度の代謝能を有すると示唆されるが、さらなる確認がなお必要である。そのことを考慮すると、EpiSensA の結果は、(例えば、IATA または確定方式との関連における) 危険有害性の特定の裏付けにのみ使用できる。試験での曝露時間に制約があるため、十分な代謝または酸化に 6 時間超を要するプロハプテンおよびプレハプテンは、いずれも EpiSensA では検出されない可能性がある。

6. 一部の界面活性剤は、**ATF3** および **IL-8** 遺伝子の非特異的発現により、偽陽性結果をもたらす可能性がある (4)。また、溶媒として蒸留水を用いて高濃度 (例: 100% または 50% (w/v)) で化学物質の試験を行うと、**ATF3** の非特異的発現に導く高浸透圧ストレス条件を誘発する可能性がある (4)。よって、こうした例での陽性結果は、慎重に解釈すべきである。一方、陰性結果は、被験化学物質を非感作性物質として分類する裏付けに、依然として使用できる。溶解性を評価する場合、当該化学物質が 0.0122% で溶解しないか安定分散しなければ (溶媒の選択および被験化学物質の溶解性の評価に関する段落 19 を参照)、当該化学物質は EpiSensA を用いた試験に適用できない。ただし、十分な科学的根拠を提示できれば、別の溶媒を使用可能である。細胞生存率 80% 以上を維持する濃度 (許容基準の段落を参照) において、内因性対照遺伝子

であるグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (*GAPDH*) の発現に顕著に影響を及ぼす被験化学物質は、マーカー遺伝子の発現が RT-qPCR を用いた相対定量により正確に測定できないため、本試験法に適用できない可能性がある。ただし、十分な科学的根拠を提示できれば、別の内因性対照遺伝子を使用してもよい。また、（例えば、RNA 分解の誘導により）RNA それ自体に影響を及ぼす被験化学物質、および RNA 分離システムに直接干渉する被験化学物質は、いずれも本試験法に適用できない可能性がある。特定のカテゴリーの被験化学物質に EpiSensA を適用できないことを示す証拠がある場合、そうした特定のカテゴリーの化学物質には EpiSensA を用いないこと。

7. 皮膚感作性物質（すなわち、UN GHS 区分 1）と非感作性物質との識別の裏付けに加え、EpiSensA は、確定方式や IATA などの統合的アプローチに使用される場合、感作性の強度評価に寄与すると考えられる情報（例：濃度-反応データ）も提示する。ただし、EpiSensA の試験結果が強度評価にどの程度寄与すると考えられるか判断するには、（好ましくはヒト研究に基づく）さらなるデータが必要である。

8. 定義を概要の補遺に示す。

### 試験の原理

9. EpiSensA は、目的の被験化学物質に 6 時間曝露後、RhE モデルの角化細胞活性化に関連する 4 つのマーカー遺伝子（すなわち、*ATF3*、*GCLM*、*DNAJB4*、および *IL-8*）発現の変化を定量化する *in vitro* 試験法である。マーカー遺伝子発現の相対変化を、RT-qPCR を用いて定量化する。細胞毒性も同時に評価することで、マーカー遺伝子の発現増加が細胞毒性を下回る濃度（細胞生存率 80%以上）で生じるか否か判定する。マーカー遺伝子の相対誘導について、溶媒対照と比較して算出する。EpiSensA では、細胞生存率 80%以上を維持しながら、少なくとも 1 つのマーカー遺伝子の発現がそれぞれのカットオフ値（*ATF3* : 15 倍、*GCLM* : 2 倍、*DNAJB4* : 2 倍、*IL-8* : 4 倍）を超えた場合、被験化学物質は陽性とみなされる。そのため、最大誘導倍率 (*I<sub>max</sub>*) の平均値は、細胞生存率の平均値 80%以上を維持する濃度データにより求める。

10. EpiSensA の定常的使用に先立ち、試験実施施設は、本試験ガイドラインの付録—補遺 1 に収載された 10 種類の習熟度確認物質を用いて、技術的習熟度を立証すること。本試験法の使用者は、バリデーション試験において習熟度確認物質から得られたマーカー遺伝子ごとの *I<sub>max</sub>* の範囲について、補遺 2 を参考にしてもよい。

### 手順

11. EpiSensA 標準操作手順書は、「規制当局承認に向けた代替法の追跡システム (TSAR)」(14) から入手可能であり、試験実施施設で本試験法を実施および使用する際に取り入れるべきである。以降の段落では、EpiSensA の主要な構成要素および手順—濃度設定試験および主試験（遺伝子発現解析）の 2 段階からなる—について説明する。

#### 試験系の一般的特性

12. 上皮の再構築には、ヒト由来の非形質転換角化細胞を用いること (15)。機能する角質層の下に、多層の生存上皮細胞（基底層、有棘層、顆粒層）が存在すること。角質層は、必須の脂質プロファイルを含む多層構造であり、頑健性を備えた機能的バリアの形成により、細胞毒性のベンチマーク化学物質

（例：界面活性剤ラウリル硫酸ナトリウム（SLS）をバリア機能試験に使用）の急速な浸透に耐えられること。RhE モデルの封じ込め特性により、皮膚曝露モデル不良に導くと考えられる、角質層周囲での物質の生存組織への透過を回避すること。RhE モデルは、細菌、ウイルス、マイコプラズマ、真菌により汚染されていないこと。

機能条件

バリア機能

13. RhE モデルの開発者／供給者は、RhE モデルの各バッチがバリア機能について定められた品質管理基準を満たすよう確保すること。バリア機能の立証および評価は、ベンチマーク化学物質（例：SLS）を一定時間曝露後に、組織の生存率が 50%低下する濃度（IC50）を求めることにより、または、ベンチマーク化学物質を特定の固定濃度で適用時に、細胞生存率の 50%低下に要する曝露時間（ET50）を求めることにより行うこと。

形態

14. RhE モデルの組織学的検査については、（段落 12 記載の多層の角質層など）ヒト表皮様構造を立証した RhE モデル開発者／供給者により行われること。

再現性

15. RhE モデルの開発者／供給者は、長期的な再現性をモニターするために、生存率およびバリア機能試験の品質管理（QC）出荷試験結果のデータベースを保持すること。EpiSensA の使用者は、EpiSensA の陽性対照および溶媒（すなわち陰性）対照の結果のデータベースを保持し、試験法実施の長期的な再現性をモニターすることが推奨される。

品質管理（QC）

16. RhE モデルでは、使用した RhE モデルの各バッチが定められた製造出荷基準—中でも、バリア機能（段落 13）および形態（段落 14）に関する基準が最も重視される—を満たしていると RhE モデルの開発者／供給者が立証した場合にのみ使用すること。これらのデータを RhE 試験法の使用者に提供して、使用者がその情報を試験報告書に記載できるようにすること。IC50 または ET50 の許容範囲（上限および下限）は、RhE モデルの開発者／供給者が確立すること（15）。高い信頼性で予測するには、適格性が確認された組織により得られた結果のみが受け入れ可能である。付録 IC の対象となる本試験法の許容範囲を表 1 に示す。

表 1.付録 IC の対象となる RhE モデルの QC バッチ出荷基準

RhE モデル	許容下限値	許容上限値
LabCyte EPI-MODEL 24 (SLS で 18 時間処理) (13)	IC <sub>50</sub> =1.4 mg/mL	IC <sub>50</sub> =4.0 mg/mL

RhE モデルの作製

17. EpiSensA は、RhE モデルを用いて実施すること。LabCyte EPI-MODEL 24 キット（品番：401124）は株式会社ジャパン・ティッシュエンジニアリング（J-TEC）から入手可能で、現在、EpiSensA において使用可能な唯一のモデルである。それ以外の RhE モデルは、PS（6）に基づくバリデーション試験の実施後に使用できる。

18. RhE モデルは、LabCyte EPI-MODEL 24 キット（品番：401124）付属のアッセイ培地において、加湿雰囲気下  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  で培養する。

#### 溶媒の選択および被験化学物質の溶解性の評価

19. 溶解性の評価を試験実施前に行う。各化学物質の溶解性を評価し、目視により確認する。そのため、被験化学物質を濃度 50% で溶解または安定分散させ、溶媒については、第一の選択肢としてアセトンとオリーブ油を 4:1 で混和した混液（AOO、アセトン中 20% v/v のオリーブ油）（例：被験化学物質 0.1 g を測定し、AOO 0.1 mL を添加）、第二の選択肢として蒸留水（DW）、あるいは、第三の選択肢として DW 中 50% v/v のエタノール（50% EtOH）とする。いずれの溶媒中でも、濃度 50% で被験化学物質が溶解も安定分散もしない場合（すなわち、室温で調製後 10 分以内に被験化学物質が溶媒から別の相へと沈殿も分離もしないコロイドまたは懸濁液の状態）、50% を起点に 0.0122% までの 2 倍段階希釈により最高溶解濃度を求めること。被験化学物質が 0.0122% で溶解も安定分散もしない場合、当該化学物質は EpiSensA を用いた試験には適用できない。適切な溶媒とは、試験した最高濃度で被験化学物質が溶解するか安定分散する溶媒と定義する。測定した最高濃度が、メスフラスコの体積あたり重量で調製できるか否か検証すること。溶解性または安定分散性の最高濃度の測定結果が 0.0488%、0.0244%、0.0122% であれば、次の段階の濃度設定試験（段落 20～26）は省略可能であり、主試験を実施すること（段落 27 参照）。AOO、DW、または 50% EtOH 以外の溶媒を使用する場合、その溶媒を使用する適切な科学的根拠を示すこと。

#### 濃度設定試験

20. 濃度設定試験を実施し、主試験（主試験（遺伝子発現解析）の段落を参照）に使用する被験化学物質の濃度を測定する。主試験では、細胞生存率の平均値が 80% 以上を示す被験化学物質濃度を使用すべきであるが、陰性判定では、少なくとも 1 つの細胞生存率の平均値が 80% 未満であること。よって、濃度設定試験では、細胞生存率 80% 未満に誘導する被験化学物質の最低濃度を測定する。

#### 濃度設定試験用の被験化学物質および対照物質の調製

21. 被験化学物質は試験当日に調製し、段落 19 に規定したとおり、測定された最高濃度で適切な溶媒に溶解または安定分散させる。最高濃度を起点に、対応する溶媒中で 0.0122 または 0.0244% (w/v) まで 4 倍段階希釈により調製する。そのため、表 2 に例示するとおり、開始濃度に応じて複数の希釈液を調製し試験を行う。被験化学物質の調製に用いられる対応する溶媒は、溶媒対照として使用する。細胞生存率の算出には、無処置対照と死滅対照の両方を用いる。無処置対照は細胞生存率 100% の定義に使用され、死滅対照は細胞生存率 0% の定義に使用される（段落 25 を参照）。EpiSensA では、死滅対照の対照物質として Triton X-100 を使用する。Triton X-100 は、DW で 10% (w/v) 溶液として調製すること。死滅対照に Triton



X-100 以外の対照物質を使用する場合、その物質を使用する適切な科学的根拠を示すこと。

#### 濃度設定試験用の被験化学物質および対照物質の適用

22. 被験化学物質ごとに、主試験（遺伝子発現解析）に使用する濃度を決定するため、1 回のランが必要である。被験化学物質の濃度ごとおよび無処置対照には RhE 1 組織、また、死滅対照には 2 つの組織ユニットを細胞生存率測定に使用する（表 2）。標準溶液として調製した被験化学物質（5  $\mu$ L）および Triton X-100 溶液（10  $\mu$ L）を、ポジティブディスプレイメントピペットチップを用いて各表皮表面の中央部に適用する。次に、処置した組織ユニットを、加湿雰囲気下  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  で 6 時間インキュベートする。

表 2. 24 ウェルプレートを用いた濃度設定試験のプレートレイアウトの例

1. 無処置	2. 死滅対照	3. 死滅対照	13. 被験化学物質 B 0.012% w/v	14. 被験化学物質 B 0.049% w/v	15. 被験化学物質 B 0.20% w/v
4. AOO	5. DW	6. 50% EtOH	16. 被験化学物質 B 0.78% w/v	17. 被験化学物質 B 3.13% w/v	
7. 被験化学物質 A 0.024% w/v	8. 被験化学物質 A 0.098% w/v	9. 被験化学物質 A 0.39% w/v			
10. 被験化学物質 A 1.56% w/v	11. 被験化学物質 A 6.25% w/v	12. 被験化学物質 A 25% w/v			

AOO：アセトン-オリーブ油混液（4:1 v/v）、DW：蒸留水

50% EtOH：DW 中 50% v/v のエタノール

### 細胞毒性の評価

23. 細胞生存率は、色素としてホルマザンを用いた乳酸脱水素酵素（LDH）アッセイにより測定する。LDH はすべての細胞型に存在する安定した細胞質酵素で、細胞膜損傷の結果として細胞培地中に放出される。LDH アッセイでは、放出された LDH により生成されるホルマザン色素量を測定する。LDH アッセイにおける被験化学物質の干渉（すなわち、LDH 反応の阻害）基準は、TSAR（14）に記載されている。

24. 6 時間曝露後、各試料の培地 50  $\mu$ L を 96 ウェルプレートのウェルに静置し、各ウェルに等量（すなわち 50  $\mu$ L）の乳酸塩およびテトラゾリウム塩を含有する基質液を添加する。プレートを遮光下室温で 30 分間インキュベートし、1 mol/L 塩酸（HCl）25  $\mu$ L/well を添加することで反応を停止させる。次に、96 ウェルプレート吸光度リーダーを用い、490 nm または 492 nm における各ウェルの吸光度を参照波長（600 nm 以上）と共に測定する。吸光度変化量（ $\Delta$ abs）を、490 nm または 492 nm での吸光度から参照波長での吸光度を減じることにより算出する。HCl 添加直後（1 時間以内）に吸光度を測定すること。

25. 細胞生存率は、以下の式を用いて算出できる。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = 100 \frac{\text{被験化学物質処理時の } \Delta\text{abs} - \text{無処置対照の } \Delta\text{abs}}{\text{死滅対照の } \Delta\text{abs の 平均値} - \text{無処置対照の } \Delta\text{abs}} \times 100$$

26. LDH アッセイが目的の被験化学物質に適用できない場合、別の細胞毒性アッセイ（例：MTT アッセイまたは ATP アッセイ）を使用できる。MTT アッセイでは、細胞内のミトコンドリアにおける代謝活性を測定する。本試験法では、生体染色色素 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、チアゾリルブルー、CAS 番号 298-93-1] を酵素により青色のホルマザン塩に変換し、これを組織から抽出後に定量測定する。同種の方法である ATP アッセイは、組織を溶解させ、組織中に存在する ATP の定量結果に基づき生細胞数を測定する。したがって、MTT アッセイも ATP アッセイも使用した組織から total RNA を分離できない。そのため、MTT アッセイまたは ATP アッセイを使用する場合、遺伝子発現解析に用いる組織とは別に、細胞毒性評価に用いる組織が必要である。PS (6) に基づき、十分な科学的根拠が示されれば、別の方法（例：XTT アッセイ）を使用できる。

### 主試験（遺伝子発現解析）

#### 主試験用の被験化学物質および対照物質の調製

27. 被験化学物質の溶解または安定分散には、適切な溶媒（AOO、DW、または 50% EtOH；段落 19 参照）を用いること。濃度設定試験において細胞生存率が 80%未満となった最低濃度は、化学物質ごとの主試験における最高濃度（すなわち、開始濃度）とし、陰性判定に用いること（段落 39 を参照）。濃度設定試験において、試験したいずれの濃度でも細胞生存率が 80%以上であった場合、被験化学物質の溶解性または安定分散性の最高濃度を開始濃度として使用すること。開始濃度に基づき、対応する溶媒を用いて 2 倍段階希釈により調製し、標準溶液を得る。濃度設定試験において細胞生存率が 80%未満となった最低濃度、あるいは溶解性または安定分散性の最高濃度を含め、3 種類以上の濃度を使用すること。この条件を満たさない被験化学物質は、なお 1 種類または 2 種類の濃度で試験できる（すなわち、主試験での最高試験濃度は 0.0122 または 0.0244% (w/v) である）。溶解性の確認に際し測定された濃度が 0.0244 または 0.0122% (w/v) である場合、それぞれ 2 種類の濃度（0.0244 および 0.0122% w/v）のみまたは 1 種類の濃度（0.0122% w/v）のみ使用できる。同様に、濃度設定試験において、細胞生存率 80%未満に誘導する被験化学物質の最低濃度が 0.0244 または 0.0122% (w/v) である場合、それぞれ 2 種類の濃度（0.0244 および 0.0122% w/v）のみまたは 1 種類の濃度（0.0122% w/v）のみ使用できる。この場合、当該被験化学物質を皮膚感作性物質と特定する裏付けのため、陽性反応をなお使用できる。そうでない場合、結果から結論が得られないとみなすこと（予測モデルに関する段落 39 を参照）。溶媒対照を、段落 21 記載のとおり調製する。EpiSensA では、陽性対照としてクロトリマゾール（CAS 番号 23593-75-1、純度 98%以上）および 4-ニトロベンジルブロミド（4-NBB）（CAS 番号 100-11-8、純度 98%以上）を用い、0.78% (w/v) クロトリマゾールおよび 0.10% (w/v) 4-NBB 溶液を AOO で調製する（標準溶液）。細胞生存率を算出するため、段落 21 記載のとおり、無処置対照および死滅対照を調製する。死滅対照に Triton X-100 以外の対照物質を使用する場合、その物質を使用する適切な科学的根拠を示すこと。

## 主試験用の被験化学物質および対照物質の適用

28. 被験化学物質ごとに、予測を得るため 1 回のランが必要である。遺伝子発現解析には、被験化学物質の濃度ごと、陽性対照物質、および溶媒対照に 3 つの組織ユニット、死滅対照に 2 つの組織ユニット、また、無処置対照に 1 つの組織ユニットを使用する。組織ユニット数以外は、段落 22（表 3）の記載と同じ条件を適用する。

表 3.主試験のプレートレイアウトの例

1. 無処置	2. 死滅対照	3. 死滅対照	13. 被験化学物 質 A 1.56% w/v	14. 被験化学物 質 A 1.56% w/v	15. 被験化学物 質 A 1.56% w/v
4. AOO	5. AOO	6. AOO	16. 被験化学物 質 A 3.13% w/v	17. 被験化学物 質 A 3.13% w/v	18. 被験化学物 質 A 3.13% w/v
7. クロトリマ ゾール 0.78% w/v	8. クロトリマ ゾール 0.78% w/v	9. クロトリマ ゾール 0.78% w/v	19. 被験化学物 質 A 6.25% w/v	20. 被験化学物 質 A 6.25% w/v	21. 被験化学物 質 A 6.25% w/v
10. 4-NBB 0.10% w/v	11. 4-NBB 0.10% w/v	12. 4-NBB 0.10% w/v			

AOO：アセトン-オリーブ油混液（4:1 v/v）、4-NBB：4-ニトロベンジルブロミド

## 細胞毒性の評価

29. 被験化学物質に 6 時間曝露後、段落 23～26 記載のとおり細胞生存率を測定する。

## RNA 分離

30. 遺伝子発現解析に向け、組織表面をリン酸緩衝生理食塩水 0.5 mL で 3 回洗浄し組織を採取後、試験法の開発およびバリデーション中に使用した 2 つの溶解法（TRIzol 試薬とボルテックスミキサー、またはシュレッターカラムと遠心分離器）の 1 つを用いて溶解する。

31. mRNA を含む total RNA は、市販の試薬キット（例：試験法の開発およびバリデーション中に使用した RNeasy Mini キット）を用いて、溶解した RhE 組織試料から分離する。

32. RNA 濃度を定量し、また、RNA 分析装置（例：NanoDrop™、Thermo Fisher Scientific）を用いて、機器供給業者から提供されたプロトコールに従って各試料の RNA の品質を分析する。相補 DNA（cDNA）合成には、500 ng 超の RNA が必要である。RNA の濃度および品質は、この後の RT-qPCR で使用する試薬の供給業者が記載した推奨事項（例：RNA 濃度 100 ng/μL 以上、かつ A260/A280 比の範囲が 1.8～2.0）と

一致させること。

### RT-qPCR

33. cDNA は、市販の試薬（例：試験法の開発およびバリデーション中に使用した Superscript III First-Strand Synthesis System）を用いて合成する。
34. cDNA 合成後、マーカー遺伝子（すなわち、*ATF3*、*GCLM*、*DNAJB4*、および *IL-8*）ならびに内因性対照遺伝子（すなわち、*GAPDH*）の発現量を、RT-qPCR により分析する。*EpiSensA 標準操作手順書*（14）記載の方法（すなわち、TaqMan Gene Expression Assay および TaqMan Universal PCR Master Mix）を用いること。遺伝子発現解析に別の試薬を用いる場合、その試薬を用いる適切な科学的根拠が示されれば使用できる。PS（6）に基づき、十分な科学的根拠が示されれば、遺伝子発現の変化を定量化する別の方法を使用できる。

## データおよび報告

### データの評価

35. 相対的な遺伝子発現について、RT-qPCR を用いて分析する。サイクル閾値（Ct 値）に基づき、 $\Delta Ct$  値、 $\Delta\Delta Ct$  値、および誘導倍率を以下の式に従って算出する。

$$\text{マーカー遺伝子の } \Delta Ct \text{ 値} = \text{マーカー遺伝子の Ct 値} - \text{GAPDH の Ct 値}$$

$$\text{マーカー遺伝子の } \Delta\Delta Ct \text{ 値}$$

$$= \text{マーカー遺伝子の } \Delta Ct \text{ 値} - \text{マーカー遺伝子（溶媒対照）の } \Delta Ct \text{ 値}$$

$$\text{誘導倍率} = 2^{-\text{マーカー遺伝子の } \Delta\Delta Ct \text{ 値}}$$

細胞生存率も、段落 25 に提示した式に従って算出する。

### 許容基準

36. 1 回のラン結果を妥当とみなすには、以下の許容基準を満たすこと。
- 溶媒対照について、2 つ以上の組織ユニットの細胞生存率が 95%以上であること。細胞生存率が溶媒対照 1 つでのみ 95%未満である場合、残りの 2 つの組織ユニットから得られた Ct 値を使用すること。

- 陽性対照（すなわち、0.78% [w/v] クロトリマゾールおよび 0.10% [w/v] 4-NBB）のいずれも、細胞生存率の平均値が 80%以上であること。
- 陽性対照である 0.78% (w/v) クロトリマゾールでは、*ATF3* および *IL-8* の誘導倍率の平均値がカットオフ値を超えていること（すなわち、*ATF3* の誘導倍率の値は 15 超、かつ *IL-8* の誘導倍率の値は 4 超であること）。
- 陽性対照である 0.10% (w/v) 4-NBB では、*GCLM* および *DNAJB4* の誘導倍率の平均値がカットオフ値を超えていること（すなわち、*GCLM* の誘導倍率の値は 2 超、かつ *DNAJB4* の誘導倍率の値は 2 超であること）。

37. 試験濃度の結果を妥当とみなすには、以下の許容基準を満たすこと。

- 少なくとも 1 つの試験濃度結果について、細胞生存率の平均値が 80%以上を示すこと。所定の試験濃度について細胞生存率の平均値が 80%未満である場合、当該の試験濃度結果は陽性予測から除外すべきであるが（特定のケースについては段落 42 を参照）、陰性予測には使用できる（段落 39 を参照）。
- 所定の被験化学物質濃度について、*GAPDH* の平均 Ct 値が対応する溶媒対照の *GAPDH* の平均 Ct 値の $\pm 1$  の範囲内である場合、その濃度で得られた結果は許容可能である。

#### 予測モデル

38. 各被験化学物質の予測結果（陽性または陰性）を得るには、1 回のラン結果について評価する。以下の条件を少なくとも 1 つ満たした場合、EpiSensA での予測は陽性とみなされる。

- *ATF3* の *I*<sub>max</sub> が、少なくとも 1 つの試験濃度で 15 超となる。
  - *GCLM* の *I*<sub>max</sub> が、少なくとも 1 つの試験濃度で 2 超となる。
  - *DNAJB4* の *I*<sub>max</sub> が、少なくとも 1 つの試験濃度で 2 超となる。
  - *IL-8* の *I*<sub>max</sub> が、少なくとも 1 つの試験濃度で 4 超となる。

39. 以下 3 つの条件を満たした場合、EpiSensA での予測は陰性とみなされる。

- マーカー遺伝子の誘導倍率の平均値が、いずれの試験濃度でも 4 つの遺伝子それぞれのカットオフ値を超えない。
- 3 種類以上の濃度で試験を行った。
- 特定の試験濃度において、少なくとも 1 つの細胞生存率の平均値が 80%未満である。

主試験の最高試験濃度が 0.0244 または 0.0122% (w/v) であった場合、結果を陰性とみなさず、結論が得られないとみなすこと（段落 27 を参照）。



40. 起こりうるケースとして、4 つのマーカー遺伝子すべてで、誘導倍率の平均値が試験濃度でそれぞれのカットオフ値を超えないものの、試験濃度のすべてで細胞生存率の平均値が 80%以上になる場合がある。こうしたケースでは、主試験での最高試験濃度が溶解性または安定分散性の最高濃度と等しかった場合、当該被験化学物質の結果は陰性と判定する。ただし、主試験での最高試験濃度が溶解性または安定分散性の最高濃度より低かった場合、1 回目の主試験で用いた最高濃度より高濃度を起点とした 2 倍段階希釈により、追加の主試験を実施すること（図 1）。この追加試験において、被験化学物質の細胞生存率の平均値が、溶解性および安定分散性の最高濃度のいずれでも 80%未満（固体の物質の場合）または 100%未満（液体の場合）にならない場合、当該被験化学物質の結果は陰性と判定する。

41. 試験濃度 0.0122% (w/v) 以上において細胞生存率の平均値がすべて 80%未満である場合、予測では結論が得られないとみなす。

図 1.EpiSensA での予測モデルの概要フローチャート



42. それ以外に起こりうるケースとして、細胞生存率の平均値が 80%未満を示す最低濃度においてのみ、マーカー遺伝子の誘導倍率の値がカットオフ値を超える場合もある。こうしたケースでは、誘導が細胞毒性濃度（細胞生存率の平均値が 80～95%）で生じたか否かを判定するため、より狭い範囲での濃度-反応解析およびより小さな希釈係数（例： $\sqrt{2}$  [=1.41] 倍希釈）を用いて被験化学物質の再試験を行うこと。

### 試験報告書

43. 試験報告書には、以下の情報を含めること。

#### 被験化学物質

- 単一成分物質
- IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式、および／またはその他の識別子（バッチ／ロット番号および有効期限など）などの化学的識別情報
- 入手可能な範囲での外観、水への溶解度、分子量、およびその他の関連する物理化学的性状
  - 純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的識別情報など
  - 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉碎）

- 試験濃度
- 入手可能な範囲での保存条件および安定性
- 各被験化学物質についての溶媒選択の正当性。
- 多成分物質、UVCB、混合物：
- 入手可能な範囲での成分の化学的識別情報（上記参照）、純度、定量的組成、および関連のある物理化学的性状（上記参照）などにより可能な限り特徴付けること
- 入手可能な範囲での外観、水への溶解度、およびその他の関連する物理化学的性状
- 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
  - 入手可能な範囲での保存条件および安定性
  - 各被験化学物質についての溶媒選択の正当性。

#### 対照

- 陽性対照
- IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式、および／またはその他の識別子などの化学的識別情報
- 入手可能な範囲での外観、水への溶解度、分子量、およびその他の関連する物理化学的性状
  - 純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的識別情報など
  - 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉碎）
  - 試験濃度
  - 入手可能な範囲での保存条件および安定性
- 該当する場合、適切なラン許容基準であることを示す既存の陽性対照結果への言及。

- 溶媒対照
- IUPAC または CAS 名、CAS 番号、および／またはその他の識別子などの化学的識別情報
  - 純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的識別情報など
- 本付録記載以外の溶媒対照を用いる場合でかつ入手可能な範囲での外観、分子量、およびその他の関連する物理化学的性状
- 入手可能な範囲での保存条件および安定性
  - 各被験化学物質についての溶媒選択の正当性。

### 試験条件

- 試験依頼者名、試験施設名、試験責任者名および所在地
- 使用する試験法の説明
- 使用した RhE モデル（バッチ番号を含む）
- 490（または 492）nm および 600 nm 以上での読み取り用に装備した 96 ウェルプレート吸光度リーダー
- 使用した RNA 抽出法
- RNA 濃度測定用の分光光度計
- 使用したサーマルサイクラーおよび RT-qPCR システム（例：モデル）—機器の設定、プライマー、ならびに逆転写（RT）および PCR に関する試薬を含む
- モデルの既存データへの言及。これには、既存のバッチデータに関する QC データの許容性を含むべきであるが、これに限定されない。
- 本試験法実施における（例えば、習熟度確認物質の試験による）試験実施施設の習熟度、または、本試験法の長期的な再現性の立証に関する記述。

### 試験手順

- 使用した被験物質の濃度、適用手順、および曝露時間（推奨事項と異なる場合）
- 使用した評価および判定基準の記述

- 使用した試験許容基準の記述
- 試験手順を変更した場合、その記述。

### 結果

- 被験化学物質および陽性対照について得られた個々の Ct、 $\Delta$ Ct、 $\Delta\Delta$ Ct、誘導倍率、および細胞生存率の値を含むデータの一覧表、ならびに、予測モデルによる被験化学物質の評価の提示
- 遺伝子発現誘導および細胞生存率の濃度-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

- EpiSensA により得られた結果の考察

### 結論

## LITERATURE

- (1) OECD (2012)10/PART1. The adverse outcome pathway for skin sensitisation initiated by covalent binding to proteins. Part 1: Scientific evidence. Series on Testing and Assessment. ENV/JM. Mono, 168.
- (2) Saito, K., Nukada, Y., Takenouchi, O., Miyazawa, M., Sakaguchi, H., Nishiyama, N. (2013). Development of a new in vitro skin sensitization assay (Epidermal Sensitization Assay; EpiSensA) using reconstructed human epidermis. *Toxicology in Vitro*, 8, 2213-24, doi: 10.1016/j.tiv.2013.08.007.
- (3) Saito, K., Takenouchi, O., Nukada, Y., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2017). An in vitro skin sensitization assay termed EpiSensA for broad sets of chemicals including lipophilic chemicals and pre/pro-haptens. *Toxicology in Vitro*. 40, 11-25. doi: 10.1016/j.tiv.2016.12.005.
- (4) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 384: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Validation Study Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- (5) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 383: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Peer review Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- (6) OECD (2024). Series on Testing & Assessment No 396: Draft Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) test methods; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.)
- (7) OECD (2005), OECD Series on Testing and Assessment No. 34. Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment.
- (8) Mizumachi, H., Sakuma, M., Ikezumi, M., Saito, K., Takeyoshi, M., Imai, N., Okutomi, H., Umetsu, A., Motohashi, H., Watanabe, M., Miyazawa, M. (2018). Transferability and within- and between-laboratory reproducibilities of EpiSensA for predicting skin sensitization potential in vitro: A ring study in three laboratories. *Journal of Applied Toxicology*, 38(9), 1233-1243. doi: 10.1002/jat.3634.
- (9) Mizumachi, H., Watanabe, M., Ikezumi, M., Kajiwar, M., Yasuda, M., Mizuno, M., Imai, N., Sakuma, M., Shibata, M., Watanabe, S., Motoyama, J., Basketter, D., Eskes, C., Hoffmann, S., Lehman, D., Ashikaga, T., Sozu, T., Takeyoshi, M., Suzuki, S., Miyazawa, M., Kojima, H. (2024), The inter-laboratory validation study of EpiSensA for predicting skin sensitization potential. *Journal of Applied Toxicology*, 44(4), 510-525. doi: 10.1002/jat.4559.
- (10) Mizumachi, H., Suzuki, S., Sakuma, M., Natsui, M., Imai, N., Miyazawa, M. (2024), Reconstructed human epidermis-based Testing Strategy of skin sensitization hazard and potency classification using EpiSensA and *in silico* data. *Journal of Applied Toxicology*, 44(3), 415-427. doi: 10.1002/jat.4551
- (11) OECD (2023), *Guideline No. 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/b92879a4-en>
- (12) Kazem, S., Linssen, EC., Gibbs, S. (2019). Skin metabolism phase I and phase II enzymes in native and reconstructed human skin: a short review. *Drug Discovery Today*, 24(9), 1899-1910, doi: 10.1016/j.drudis.2019.06.002.
- (13) Oesch, F., Fabian, E., Landsiedel, R. (2018). Xenobiotica-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Archives of Toxicology*, 92(8), 2411-2456. doi: 10.1007/s00204-018-2232-x.
- (14) EURL ECVAM. (2023). EpiSensA standard operating procedure. Available at: <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2018-01-0>.



- (15) OECD (2021), *Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method*, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264242845-en>

## 付録 IC—補遺 1：習熟度確認物質

## In vitro 皮膚感作性：表皮感作性試験法（EpiSensA）

試験ガイドライン 442D の本補遺記載の試験法を定常的に用いるのに先立ち、試験実施施設は、表 1 で推奨される 10 種類の習熟度確認物質について、4 つの固定濃度のうち 3 つ以上で試験を行うことにより技術的習熟度を立証すること。次いで、マーカー遺伝子ごとに得られた結果が、10 種類の習熟度確認物質中 8 種類について、表 1 規定の結果と一致していること。これらの習熟度確認物質を選択したことで、皮膚感作の危険有害性に関する反応範囲の代表とした。それ以外に、対象物質が市販品であること、精選された *in vivo* 参照データおよび高品質の EpiSensA データが入手可能であること、ならびに、事前検証リング試験または JaCVAM が調整したバリデーション試験の間に使用されたことを選択基準とした。

表 1：EpiSensA の技術的習熟度の立証に推奨される物質

No.	習熟度確認物質	CAS 番号	物理的状態	<i>In vivo</i> における予測 <sup>1</sup>	溶媒	試験濃度（w/v%）	マーカー遺伝子ごとの EpiSensA の結果 <sup>2</sup>			
							ATF3	GCLM	DNAJB4	IL-8
1	2,4-ジニトロクロロベンゼン	97-00-7	固体	感作性物質 (GHS 区分 1A)	AOO	0.39, 0.20, 0.10, 0.05	p	p	p	p/n
2	p-フェニレンジアミン	106-50-3	固体	感作性物質 (GHS 区分 1A)	AOO	1.56, 0.78, 0.39, 0.20	p/n	p	p	p/n
3	メチルヘプチンカルボナート	111-12-6	液体	感作性物質 (GHS 区分 1A)	AOO	3.13, 1.56, 0.78, 0.39	p	p	p	p
4	メトール	55-55-0	固体	感作性物質 (GHS 区分 1A)	DW	3.13, 1.56, 0.78, 0.39	p	p	p	p/n
5	アビエチン酸	514-10-3	固体	感作性物質 (GHS 区分 1B)	AOO	12.5, 6.25, 3.13, 1.56	p	p	p	p
6	ファルネソール	4602-84-0	液体	感作性物質 (GHS 区分 1B)	AOO	12.5, 6.25, 3.13, 1.56	p	p/n	p	p
7	アミルシンナムアルデヒド	122-40-7	液体	感作性物質 (GHS 区分 1B)	AOO	100, 50, 25, 12.5	p	n	p	p
8	セトリミド	57-09-0	固体	非感作性物質 (区分なし)	50%EtOH	1.56, 0.78, 0.39, 0.20	n	n	n	n
9	乳酸 <sup>3</sup>	50-21-5	液体	非感作性物質 (区分なし)	DW	6.25, 3.13, 1.56, 0.78	n	n	n	n
10	ヘキサン	110-54-3	液体	非感作性物質 (区分なし)	AOO	100, 50, 25	n	n	n	n

1: *In vivo* における危険有害性および強度の予測結果は、LLNA データに基づく（試験ガイドライン 497 付属文書補遺 3）（Urbisch, 2015）。*In vivo* における強度は、UN GHS 細区分に基づく基準により導かれる。

2: 「p」は、マーカー遺伝子の誘導倍率がカットオフ値を超え、細胞生存率が 80%以上であることを示す。「n」は、マーカー遺伝子の誘導倍率がカットオフ値を超えず、細胞生存率が 80%以上でないことを示す。「p/n」は、「p」と「n」の両方が当てはまることを意味する。

3: LDH アッセイではなく、MTT アッセイを実施すること。

## 付録IC—補遺2：習熟度確認物質のImaxの範囲

ここに挙げた値は情報提供を目的とし、バリデーション試験（1）および事前検証リング試験（2）に参加した試験実施施設で得られたImaxの範囲を反映している。この範囲は本試験ガイドラインの一部ではないが、定常的に使用する前に、EpiSensAを初めて設定する試験実施施設には有用であると考えられる。

表1：習熟度確認物質について得られたマーカー遺伝子ごとのImaxの範囲

No.	習熟度確認物質	CAS 番号	In vivo における予測 <sup>1</sup>	N2	マーカー遺伝子ごとの Imax の範囲			
					ATF3	GCLM	DNAJB4	IL-8
1	2,4-ジニトロクロロベンゼン	97-00-7	感作性物質 (GHS 区分 1A)	9	30.4-133.2	6.4-18.9	6.2-17.3	2.9-5.9
2	p-フェニレンジアミン	106-50-3	感作性物質 (GHS 区分 1A)	8	2.4-66.1	11.1-24.3	4.6-22.3	0.8-3.5
3	メチルヘプチンカルボナート	111-12-6	感作性物質 (GHS 区分 1A)	8	113.9-823	9.5-84	40.8-175.7	9.5-74.4
4	メトール	55-55-0	感作性物質 (GHS 区分 1A)	9	130.7-460.5	11.6-22.6	16.6-35.9	3.2-8.0
5	アビエチン酸	514-10-3	感作性物質 (GHS 区分 1B)	7	74-410	2.9-4.9	2.9-5.8	39.4-153.9
6	ファルネソール	4602-84-0	感作性物質 (GHS 区分 1B)	7	48.4-378.2	0.7-5.3	2.9-5.8	90.4-547.9
7	アミルシンナムアルデヒド	122-40-7	感作性物質 (GHS 区分 1B)	3	116.1-250.7	1-1.3	3.1-5.2	163.8-265.5
8	セトリミド	57-09-0	非感作性物質 (区分なし)	9	1.2-8.3	0.6-1.4	0.6-1.4	1.6-3.0
9	乳酸 <sup>3</sup>	50-21-5	非感作性物質 (区分なし)	7	1.1-2.5	1.1-1.5	0.9-1.2	1.5-3.1
10	ヘキサン	110-54-3	非感作性物質 (区分なし)	9	1.4-5.6	0.7-1.8	0.7-1.3	1-1.7

<sup>1</sup> In vivoにおける危険有害性および強度の予測結果は、LLNAデータに基づく（試験ガイドライン497付属文書補遺3）（Urbisch, 2015）。In vivoにおける強度は、UN GHS細区分に基づく基準により導かれる。

<sup>2</sup> Imax範囲を算出するためのEpiSensAの結果数。

(1) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 384: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Validation Study Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>

(2) Mizumachi, H., Sakuma, M., Ikezumi, M., Saito, K., Takeyoshi, M., Imai, N., Okutomi, H., Umetsu, A., Motohashi, H., Watanabe, M., Miyazawa, M. (2018). Transferability and within-

and between- laboratory reproducibilities of EpiSensA for predicting skin sensitization potential in vitro: A ring study in three laboratories. *Journal of Applied Toxicology*, 38(9), 1233-1243. doi: 10.1002/jat.3634.