試験ガイドライン No.442D

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

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません。**本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。
本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。
This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (2022), Test No. 442D: In vitro skin sensitisation assays addressing the Adverse Outcome Pathway Key Event on Keratinocyte activation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2024/10/replaced-and-deleted-test-guidelines-2024/TG-442D-keratinocyte-activation-2022.pdf.

©OECD(2022)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at http://www.oecd.org/termsandconditions/

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 Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

キーイベントに基づく試験ガイドライン　442D

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（3）。

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、以下の通りである:

- 角化細胞株レポーターアッセイ KeratinoSens™試験法（付録 IA）、および
- 角化細胞株レポーターアッセイ LuSens 試験法（付録 IB）。

3. この 2 種類の *in vitro* 角化細胞株レポーターアッセイ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）による独立した第三者評価、および EURL ECVAM による承認勧告を受けており、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）。

4. 本試験ガイドラインに含まれる試験法は、データおよび読み出し測定値の取

© OECD 2022

得に用いられる手順との関連においては異なる可能性があるが、角化細胞活性化に関する AOP のキーイベントを対象とした皮膚感作性試験の結果に関する各国の要件に取り組む目的では、区別なく用いることができ、同時にデータ相互受け入れ制度（Mutual Acceptance of Data：MAD）の恩恵を受けられる。

これらの試験方法の背景および原理は、キーイベントに基づく試験ガイドラインに含まれる。

5. 皮膚感作性の評価には、通常、実験動物が使用されてきた。広く知られている Magnusson と Kligman のモルモットを用いるマキシマイゼーション法（Guinea Pig Maximisation Test：GPMT）およびビューラー法（Buehler Test：OECD TG 406）（11）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）（12）、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）（13）、LLNA：BrdU-ELISA および BrdU-FCM（OECD TG 442B）（14）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。

6. 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（15）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（12）。

7. 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（2）（17）、この特異的な主要事象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（17）。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（17）、IATA における有効な要素として活用することができる。

8. 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）に規定されたサブカテゴリーである 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。

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

© OECD 2022

物質のことであり [1]、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、被験物質は暴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暴露用培地に溶解／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（18）（19）（20）。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。

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]

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

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.

[1] 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。

© OECD 2022

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 KeratinoSensTM assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation].

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].

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 (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].

12) 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].

13) 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].

14) OECD (2010). 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].

15) OECD (2015). 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].

16) OECD (2017). 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].

17) 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

© OECD 2022

Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [https://community.oecd.org/community/iatass].

18) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSensTM assay to evaluate plant extracts: A pilot study. Toxicology In Vitro 27, 1220-1225.

19) 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.

20) 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.

© OECD 2022

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：同じ溶媒／媒体に暴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：溶媒（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。

© OECD 2022

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反復する対照。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される物質。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るべきであり、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。

© OECD 2022

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経時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）。

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

特異度：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媒は除く（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）。

© OECD 2022

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]
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
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.

© OECD 2022

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第三者評価に用いられたバリデーション試験の結果および本試験法の開発施設から得られたデータセットに基づくと、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第三者評価用に EURL ECVAM に提出されたすべてのデータによると、LLNA の結果と比較した場合、KeratinoSens™試験法による皮膚感作性物質（すなわち、UN GHS カテゴリー1）と非感作性物質とを識別する正確度は 77%（155/201）、感度は 78%（71/91）、特異度は 76%（84/110）であった（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™試験法は有機官能基を含む被験物質の評価および反応メカニズム、（*in vivo* 試験により判定される）皮膚感作性の強度、物理化学的特性の検討に適用できることが示された（3）（6）（7）（8）。本試験法は、暴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、溶媒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 µM 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 µM 未満であって細胞毒性に達

© OECD 2022

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 μM 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暴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 μM を超える濃度の植物性エストロゲンの場合、ルシフェラーゼを利用した別のレポーター遺伝子による試験法において、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を過剰に活性化させるため、発光シグナルに干渉することが報告されている（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化学物質に 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 カテゴリー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じられており（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 KeratinoSens™ 試験法の利用についても報告されている（21）（24）。

© OECD 2022

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. KeratinoSens™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死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 エレメントと融合した恒常的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暴露した後、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. KeratinoSens™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 µM 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、溶媒（陰性）対照を上回るルシフェラーゼ活性の最大誘導倍率（maximal fold induction：I_{max}）を測定する。さらに、数段階の濃度の被験物質に細胞を暴露することで、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、$EC_{1.5}$ 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 KeratinoSens™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。

11. KeratinoSens™ 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. KeratinoSens™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、

© OECD 2022

本試験法の開発企業 [2]から KeratinoSens™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。KeratinoSens™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 KeratinoSens™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、KeratinoSens™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、KeratinoSens™組換え細胞株を使用する。KeratinoSens™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、原液を初期設定濃度（40 mg/mL または 4%（w/v））に調製する。DMSO 以外の溶媒、水、または培地を用いる場合には、十分な科学的根拠を提示する。

16. DMSO または適切な溶媒（すなわち、滅菌水または培地）を用いて被験物質の原液を段階希釈し、12 段階の主要濃度のサンプルを得る（0.098～200 mM）。用いる溶媒に関わらず、次に上記主要濃度のサンプルを血清含有培地でさらに 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 µM 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 または適切な溶媒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 µg/mL で 12 段階）の被験物質溶液を得る。

[2] Givaudan Schweiz AG, CH-8310 Kemptthal

© OECD 2022

17. 同時に使用する溶媒／媒体対照（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。溶媒／媒体対照では、主要濃度について段落 16 の記載と同じ希釈を行うため、最終的な溶媒／媒体対照の濃度は 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。この溶媒／媒体対照（すなわち DMSO）は、KeratinoSens™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、KeratinoSens™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 の原液から DMSO で 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 μM の範囲となる。これ以外に、ほぼ中央の濃度範囲で $EC_{1.5}$ 値を示す適切な陽性対照は、同等の実行許容基準を満たすヒストリカル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原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 μL）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 μL 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% CO_2 存在下、37±1°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

© OECD 2022

- 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暴露した後、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（50 µL）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 時間の暴露の終了後、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_2 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認められた、ルシフェラーゼ活性の最大誘導倍率の平均値（I_{max}）
- ルシフェラーゼ活性の誘導倍率が、閾値である 1.5 倍（すなわち、ルシフェラーゼ活性の 50%上昇）を超える濃度である $EC_{1.5}$ 値
- 細胞生存率が 50%減および 30%減となる濃度である IC_{50} および IC_{30} 値

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

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

ここで

L_{sample} は、被験物質のウェルにおける発光測定値
L_{blank} は、無細胞、無処置からなる空のウェルにおける発光測定値

© OECD 2022

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

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

式 2：
$$EC1.5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1.5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

ここで

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

細胞生存率は式 3 により算出する。

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

ここで

V_{sample}は、被験物質のウェルにおける MTT 吸光度の測定値
V_{blank}は、無細胞、無処置からなる空のウェルにおける MTT 吸光度の測定値
$V_{solvent}$ は、細胞および溶媒（陰性）対照からなるウェルにおける MTT 吸光度測定値の平均値

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

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

ここで

X は、算出濃度における減少率（IC_{50}では 50、IC_{30}では 30）
C_aは、細胞生存率の減少率が x%超となる最低濃度（μM）
C_bは、細胞生存率の減少率が x%未満となる最高濃度（μM）
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（≧）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媒／媒体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

© OECD 2022

示されていることが必要であり、そうなってい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 μM）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、$EC_{1.5}$ 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 μM）の少なくとも 1 濃度において閾値 1.5 超となり、（例えば、t 検定を用いた場合）統計的に有意であること。
- 陽性対照の $EC_{1.5}$ 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と 7～30 μM の間）であること。さらに、シンナムアルデヒド 64 μM における 3 回の反復測定について、その誘導倍率の平均値が 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。
- 溶媒／媒体対照（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_{max} が 1.5 倍以上（≧）であり、溶媒／媒体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、$EC_{1.5}$ の判定濃度）において、細胞生存率が 70%超（＞）であること。

© OECD 2022

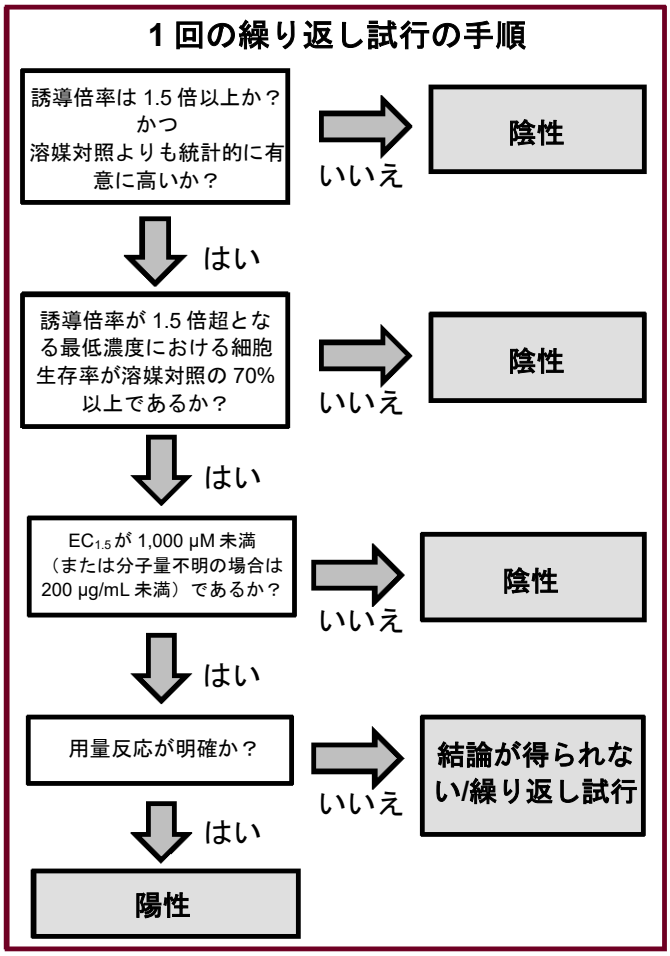
- $EC_{1.5}$ 値が 1,000 µM 未満（<）であること（または、分子量不明の被験物質の場合は 200 µg/mL 未満であること）。
- ルシフェラーゼの誘導に用量依存的な増加（または、段落 28 で述べた二相性の反応）が認められること。

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）。

© OECD 2022

図 1. KeratinoSens™試験法に用いられる予測モデル。

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。



少なくとも 2 回の独立した繰り返し試行を実施

- **2 回の繰り返し試行が陽性であった場合の最終的な結果：陽性**
- **2 回の繰り返し試行が陰性であった場合の最終的な結果：陰性**

最初の 2 回の繰り返し試行が一致しない場合、3 回目の繰り返し試行を実施し、その結果の最頻値（すなわち 3 回中 2 回）に基づいて結論を下す。

© OECD 2022

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、$EC_{1.5}$ の判定濃度が IC_{30} 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、$EC_{1.5}$ の判定濃度が IC_{30} 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
  - 暴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、粉砕など）
  - 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
  - 暴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、粉砕など）
  - 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

© OECD 2022

- 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、粉砕など）
- 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ヒストリカルデータ

- 溶媒／媒体／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媒／媒体／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媒／媒体選択の妥当性

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、または本試験法の経時的な再現性の性能を立証するのに用いた手順

© OECD 2022

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、および暴露時間（推奨事項と異なる場合）
- 評価および測定基準の記述
- 試験許容基準の記述
- 試験手順の修正があればその記述

結果

- 繰り返し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
- 実験ごとに溶媒／媒体／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
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.

© OECD 2022

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 KeratinoSensTM assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

9) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSensTM., 17 pp. Available: [http://ecvam-dbalm.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 metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

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-prohapten-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

© OECD 2022

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.

© OECD 2022

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]

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.

© OECD 2022

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、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 $EC_{1.5}$ 値および IC_{50} 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）	ヒトに関するカテゴリー（2）	KeratinoSens™による予測（3）	$EC_{1.5}$（μM）の基準範囲（4）	IC_{50}（μM）の基準範囲（5）
サリチル酸	69-72-7	固体	非感作性物質	カテゴリー6	陰性	> 1000	> 1000
乳酸	50-21-5	液体	非感作性物質	カテゴリー6	陰性	> 1000	> 1000
グリセロール	56-81-5	液体	非感作性物質	カテゴリー6	陰性	> 1000	> 1000
イソプロパノール	67-63-0	液体	非感作性物質	カテゴリー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］）	カテゴリー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］）	カテゴリー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］）	カテゴリー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］）	カテゴリー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	カテゴリー2	陽性	< 20	20 - 100

© OECD 2022

			（強い［strong］）				
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］）	カテゴリー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］。カテゴリー1 は「接触アレルギーの明確な証拠を有する」、カテゴリー2 は「しばしば接触アレルギーの原因となる」、カテゴリー3 は「接触アレルギーの一般的な原因である」、カテゴリー4 は「時折接触アレルギーの原因となる」、カテゴリー5 は「まれに接触アレルギーの原因となる」、そしてカテゴリー6 は「接触アレルギーの証拠を本質的に欠く」を表す［31］。（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］。

© OECD 2022

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 KeratinoSens™ 試験法の改変

以下に示す KeratinoSens™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（KeratinoSens™）（付録 1A）	ゼノフリーへの改変（この補遺に記載）
血清 [1]	「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 [2]	MTT：4 時間のインキュベーション後、10%SDS にて一晩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 [2]	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 [1]	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：[1]ゼノフリー条件を達成するための改変。[2]その他の改変（33）。

KeratinoSens™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。KeratinoSens™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

© OECD 2022

度 98%超）を陽性対照として使用するように最適化されている。これ以外に、ほぼ中央の濃度範囲で $EC_{1.5}$ 値を示す陽性対照は、同等の実行許容基準を満たすヒストリカル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 時間の暴露終了後、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_2 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。

© OECD 2022

付録 IA—補遺 3：発光測定値の品質管理

KeratinoSens™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 μM 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こと。

- 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_{max} がバックグラウンドの 20 倍超である（ほとんどの場合、I_{max} 値は 100～300 に達する）
- 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 以下である））

© OECD 2022

- 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）

© OECD 2022

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、性能標準をベースとする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）による独立した第三者評価が実施された（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 カテゴリー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 試験法は各種有機官能基を含む被験物質の評価および反応メカニズム、（*in vivo* 試験により判定される）皮膚感作性の強度、物理化学的特性の検討に適用できることが示された（7）（8）。本試験法は、暴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、溶媒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 µM、または分子量不明の場合は 2,000 µg/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 µM 未満（または分子量不明の場合は 2,000 µg/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 µM 未満（または分子量不明の場合は 2,000

© OECD 2022

μg/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暴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、見かけ上阻害か亢進のいずれかをもたらすことがある（16）。例えば、1 μM を超える濃度のフィトエストロゲンは、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、高濃度のフィトエストロゲン、またはフィト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 カテゴリー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の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死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）。

© OECD 2022

この細胞株は、ARE エレメント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暴露した後、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、溶媒／媒体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（24）。LuSens 試験法の主なプロトコールの各ステップを 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[3]。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、試験法プロトコー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、試験法のプロトコール（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。

[3] BASF 社、67056 ルートヴィヒスハーフェン、ドイツ

© OECD 2022

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）などの安定な溶媒に、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、原液を初期設定濃度（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、被験物質の原液を段階希釈し、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）。用いる溶媒に関わらず、次に上記主要濃度のサンプルを血清含有培地でさらに 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 µM とする）。分子量が不明の被験物質の場合、DMSO または適切な溶媒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 µg/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_{75}）をあらかじめ測定する。この CV_{75} 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_{75} より高い 1 濃度、CV_{75} ちょうど、CV_{75} より低い 4 濃度を、希釈倍率 1.2 の段階希釈、すなわち CV_{75}/2.07、CV_{75}/1.73, CV_{75}/1.44、CV_{75}/1.2、CV_{75}、および CV_{75} x 1.2 µM 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、溶媒／媒体対照（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）。溶媒／媒体対照では、主要濃度について段落 15 の記載と同じ希釈を行うため、最終的な溶媒／媒体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。使用する溶媒（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、その被験物質の溶媒濃度は他の被験物質および対照物質の場合と同じ溶媒濃度（すなわち、1%）となるように調整しなければならない。

© OECD 2022

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 μM（または 450 μg/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：プロトコール（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：プロトコールに記載の通り、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 μM 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 15 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ール（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 μM 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、溶媒／媒体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 $EC_{1.5}$ 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ヒストリカル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原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（本試験法プロトコール（24）に記載の通り、血清含有、抗生物質不含の DMEM 150 μL）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 μL 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% CO_2 存在下、37±1°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。

© OECD 2022

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暴露した後、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 時間の暴露の終了後、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_2 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_{75}）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（≧）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媒／媒体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

© OECD 2022

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 µM 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、溶媒／媒体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 µM 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、溶媒／媒体対照の平均と比較して 1.5 倍未満であること。
- 溶媒／媒体対照（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、溶媒／媒体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 µM（または分子量不明の被験物質の場合は 2,000 µg/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 µM（または分子量不明の被験物質の場合は 2,000 µg/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こらない場合は、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 x 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 µM（または分子量不明の被験物質の場合は 2,000 µg/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。

© OECD 2022

結果の解釈および予測モデル

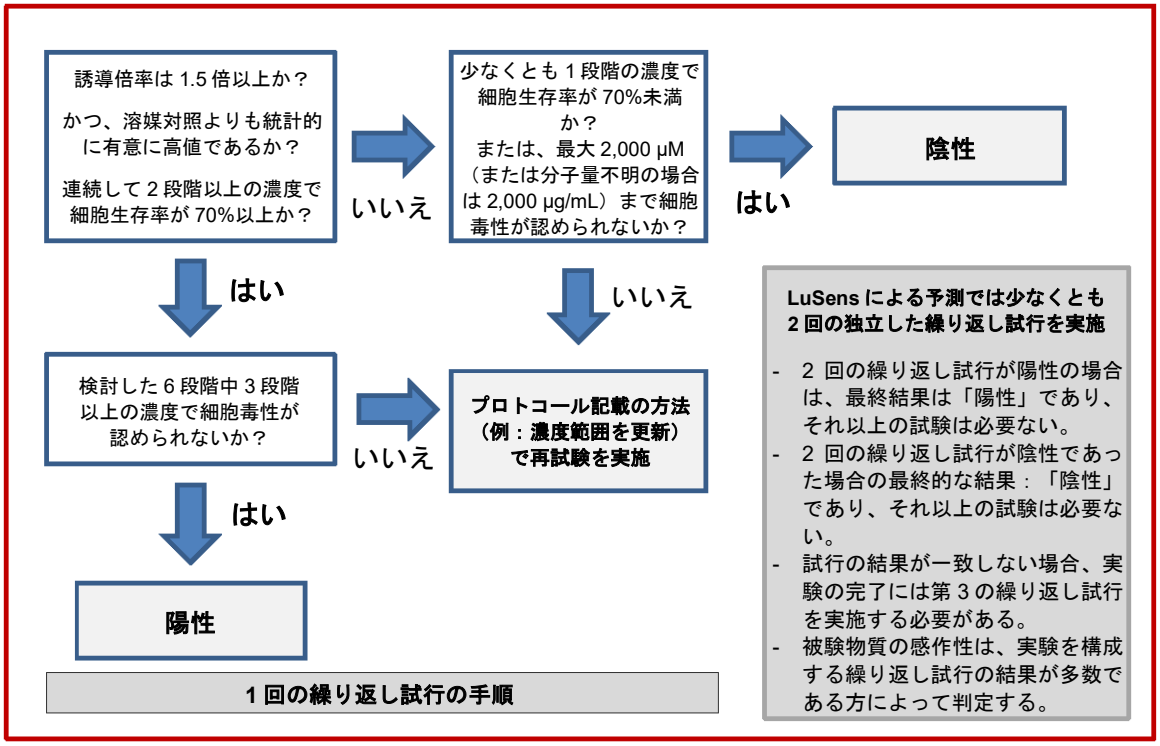
33. LuSens による予測では、2 回の繰り返し試行のうち 2 回とも、または 3 回の繰り返し試行のうち 2 回において、以下の条件を満たす場合に陽性とみなし、それ以外の場合、LuSens による予測では陰性とみなす（図 1）。

- 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（≧）である）において、ルシフェラーゼ活性誘導が 1.5 倍以上（≧）であって、そのことが溶媒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（≧）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 µM 未満（または分子量不明の被験物質の場合 2,000 µg/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 2.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。



© OECD 2022

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
  - 暴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、粉砕など）
  - 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
  - 暴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、粉砕など）
  - 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、粉砕など）

© OECD 2022

- 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ヒストリカルデータ

- 溶媒／媒体対照
  - 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媒／媒体を用いる場合、外観、分子量、および入手可能な範囲のその他の関連する物理化学的性状
  - 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媒／媒体選択の妥当性
- 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、または本試験法の経時的な再現性の性能を立証するのに用いた手順

© OECD 2022

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、および暴露時間（推奨事項と異なる場合）
- 評価および測定基準の記述
- 試験許容基準の記述
- 試験手順の修正があればその記述

結果

- 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_{75}）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
- 実験ごとに溶媒／媒体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

© OECD 2022

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

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.

11) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSensTM assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

12) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

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.

© OECD 2022

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-prohapten-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) 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.

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-dbalm.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.

© OECD 2022

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）	ヒトに関するカテゴリー（2）	LuSens		
					In Vitro 予測（3）	$EC_{1.5}$（μM）の基準範囲（4）	CV_{75}（μM）の基準範囲（4）
サリチル酸	69-72-7	固体	非感作性物質	カテゴリー6	陰性	> 1000	> 2000
グリセロール	56-81-5	液体	非感作性物質	カテゴリー6	陰性	> 1000	> 2000
イソプロパノール	67-63-0	液体	非感作性物質	カテゴリー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（Basketter *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］）	カテゴリー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］）	カテゴリー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］）	カテゴリー3	陽性	< 800	< 2000
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］）	カテゴリー3	陽性	< 30	< 50
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］）	カテゴリー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］）	カテゴリー1	陽性	< 5	< 10

© OECD 2022

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］。カテゴリー1 は「接触アレルギーの明確な証拠を有する」、カテゴリー2 は「しばしば接触アレルギーの原因となる」、カテゴリー3 は「接触アレルギーの一般的な原因である」、カテゴリー4 は「時折接触アレルギーの原因となる」、カテゴリー5 は「まれに接触アレルギーの原因となる」、そしてカテゴリー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］。$EC_{1.5}$ 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。$EC_{1.5}$ 値は付録 IA（段落 26）に従って算出した。

© OECD 2022

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
角化細胞培養液の調製		
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、およびピュ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）
被験物質および対照物質の調製		
調製	試験当日	
溶媒	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 µM 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 µM 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_{75}/2.074～CV_{75} x 1.2 µM の 6 段階の濃度（希釈倍率は 1.2）
溶媒対照	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	溶媒対照を参照	5,000 µM 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

© OECD 2022

		（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、およびピューロマイシン）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	
暴露時間	5% CO_2 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	暴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。	暴露終了後、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	暴露終了後、細胞に 5 mg/mL の MTT 溶液を加え、5% CO_2 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	暴露終了後、細胞に 200 µL の MTT 溶液（0.5 mg/mL）を加え、5% CO_2 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 **$EC_{1.5}$**：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_{50} / IC_{30}**：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_{75}**：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 µM 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 $EC_{1.5}$ は、ヒストリカルデータの平均から 2SD の範囲内（例：バリデーション用データセットで 2～30 µM）にあること 64 µM 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、溶媒対照と比較して細胞生存率が 70%以上）において、溶媒対照と比較した陽性対照（例：120 µM の EGDMA）の活性誘導倍率が 2.5 以上であること

© OECD 2022

陰性対照のルシフェラーゼ活性	適用なし	溶媒対照と比較した陰性対照（5,000 µM の DL-乳酸）の活性誘導倍率が 1.5 未満であること
媒体対照の変動	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、媒体対照と比較して、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	1. I_{max} が 1.5 倍以上（≧）であり、溶媒対照に対して統計的有意差が認められること（対応のないスチューデントの両側 t 検定） 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、$EC_{1.5}$ の判定濃度）において、細胞生存率が 70%超（>）であること 3. $EC_{1.5}$ 値が 1,000 µM 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）。 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	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（≧））において、媒体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 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（≧））
安定な分散液を形成しない化学物質	1,000 µM 未満（または、分子量不明の被験物質の場合は 200 µg/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 µM（または分子量不明の被験物質の場合 2,000 µg/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

© OECD 2022

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 件の溶媒／媒体対照ウェル（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**

© OECD 2022

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。

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

ここで

L_{sample} は、被験物質のウェルにおける発光測定値

L_{blank} は、無細胞、無処置からなる空のウェルにおける発光測定値

$L_{solvent}$ は、細胞および溶媒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。

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

ここで

V_{sample} は、被験物質のウェルにおける MTT 吸光度の測定値

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

$V_{solvent}$ は、細胞および溶媒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。

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

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（µM）

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（µM）

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（%）

© OECD 2022