

評価報告書

皮膚感作性試験代替法

ARE-Nrf2 luciferase LuSens test method (LuSens test method)

皮膚感作性試験資料編纂委員会

令和元年（2019年）9月30日

皮膚感作性試験資料編纂委員会

- 小島 幸一 (一般財団法人 食品薬品安全センター)
足利太可雄 (国立医薬品食品衛生研究所)
安達玲子 (国立医薬品食品衛生研究所)
佐藤 一博 (国立大学法人 福井大学)
瀬崎 拓人 (三井化学株式会社)
武吉正博 (一般財団法人 化学物質評価研究機構)
福山朋季 (麻布大学)

要旨

皮膚感作性は化学物質の安全性評価において重要な評価項目であり、モルモットやマウスを用いた動物実験によって評価されてきた。近年 EU における欧州化学品規制では、コンピュータを用いた定量的構造活性相関 (Quantitative Structure-Activity Relationship、以下、QSAR と記す) モデルや *in vitro* 試験法による安全性評価が推奨されており、動物実験によって安全性が評価された成分を含む化粧品の販売が禁止 (2013 年 3 月全面施行) されたことから、*in vitro* 試験法の開発が強く望まれている。

ARE-Nrf2 luciferase LuSens test method (以下、LuSens test method と記す) は、既に経済協力開発機構 (以下、OECD と記す) 試験法ガイドライン (以下、TG と記す) TG 442D に登録されている ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSens™ test method (以下、KeratinoSens™ と記す) と同様に、感作性発現機序における第 2 の Key event (「2. 試験法の原理」参照) に対応する試験法であり、基本原理は Keap1-Nrf2-ARE pathway を利用したレポーターアッセイである。

LuSens test method は、開発者 (BASF 社) によるインハウス試験および外部 4 機関の参加による TG 442D の Performance standards (以下、性能標準と記す) に基づくバリデーション研究が行われ、その結果を EURL ECVAM Scientific Advisory Committee (以下、ESAC と記す) が第三者評価し、2018 年 6 月に OECD の TG に追記された (OECD TG 442D Appendix 1B)。

本報告書は、OECD TG 442D Appendix 1B および関連資料などをもとに、試験手順をまとめ、有用性や限界などについて評価したものである。

性能標準に記載されている 20 物質のうちの 12 物質を用いた 3 機関による施設内再現性は 100%であった。性能標準に記載されている 20 物質を用いて開発者を含む 5 施設において、少なくとも 1 物質につき 3 施設以上で実施した施設間再現性は 100%であった。いずれも性能標準で要求している 80%以上であることという基準を満たしていた。

開発者によるインハウス試験においては、ヒトデータ (69 物質) と比較した場合、感度は 83%、特異度は 78%、正確度は 81%、LLNA データ (72 物質) と比較した場合、感度は 75%、特異度は 71%、正確度は 74%であった。

性能標準に記載されている 20 物質を用いて行った LuSens test method のバリデーション研究と KeratinoSens™ のバリデーションデータを比較したところ、両試験法とも 20 物質中 17 物質を正しく判定しており、正確度は 85%であった。両試験法の試験結果の詳細は、ESAC で評価され、両試験法についてどちらか一方を推奨する科学的な根拠はないとされており、両試験法の予測性はほぼ同等と本委員会では評価した。

LuSens test method は、KeratinoSens™ と同様、リジン残基特異的に結合する物質は偽陰性と判定されることが考えられ、注意が必要である。本試験法に使用する細胞株の代謝能は限定的であり、プロハプテンおよびプレハプテンは陰性となる可能性がある。一方、感作性のないケミカルストレスア (例えば酸化ストレスを誘導する物質) も KeratinoSens™ と同様、偽陽性となる可能性がある。さらに、ルシフェラーゼに干渉する化学物質も評価に影響する可能性がある。

以上の結果から、LuSens test method は、KeratinoSens™ と同様、試験の実施と評価のための戦略的統合方式 (Integrated Approaches to Testing and Assessment, 以下、IATA と記す) において他の試験法と組み合わせることにより、感作性物質と非感作性物質との区別に使用

することが可能である。しかし、本試験法単独での感作性強度分類や UN GHS (UN Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals) のサブカテゴリー分類への応用には適さない。

本委員会は、上記の本試験法の様々な限界を勘案すると、本試験法単独では皮膚感作性の判定は不十分であり、証拠の重み付けや他の試験法との組合せで用いることを推奨する。

1. 緒言

皮膚感作性を評価することは化学物質の安全性評価において重要である。化学物質の皮膚での接触感作性のリスクを動物で予測する試験法としてモルモットを用いる皮膚感作性試験 (OECD TG 406) やマウスを用いる局所リンパ節試験 (以下、LLNA と記す。OECD TG 429) がある。この³H-Methyl]-thymidine 取込量を測定する LLNA 以外に、ATP 量を測定する LLNA:DA (OECD TG 442A) や Bromodeoxyuridine 量を測定する LLNA: BrdU-ELISA および BrdU-FCM (OECD TG 442B) がある。

EU における欧州化学品規則 (REACH: Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) では、安全性評価においてはコンピューターを用いた QSAR モデルや *in vitro* 試験等による代替法の活用が推奨されており、動物実験により安全性が評価された成分を含んだ化粧品の販売が禁止された (2013 年 3 月全面施行)。そのため、化学物質の皮膚感作性を評価する代替法の開発が強く求められた。

現在、ペプチドとの結合反応を利用した Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA, OECD TG 442C)、多くの皮膚感作性物質が Antioxidant response element (ARE) に制御される遺伝子の発現を誘導することを利用した ARE-Nrf2 Luciferase Test Method (KeratinoSensTM, OECD TG 442D)、単球系細胞の活性化を利用した human Cell Line Activation Test (h-CLAT, OECD TG 442E)、U-SENSTM (OECD TG 442E) および IL-8 Luc assay (OECD TG 442E) などの皮膚感作性試験の *in vitro* 法が EURL ECVAM 等においてバリデーション研究が行われガイドライン化されている。

LuSens test method¹⁾ は、ヒトケラチノサイト由来細胞株にルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定的に導入した細胞系を使用する試験法である。EURL ECVAM によるバリデーション研究は行われず、BASF 社を中心に TG 442D の性能標準に基づくバリデーション研究が行われた^{2,3)}。その結果について、ESAC による第三者評価が行われ、2018 年 6 月に OECD の TG 442D に追記された (Appendix 1B)¹⁾。一方、KeratinoSensTM は、OECD TG 442D Appendix 1A となった。

JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会 (以下、委員会) は、LuSens test method の皮膚感作性試験代替法としての科学的妥当性について、BASF 社主導で行われたバリデーション研究の結果および現在までに公開されている情報等をもとに評価したので、その結果を報告する。

2. 試験法の原理

皮膚感作性は、ヒトでは接触皮膚炎、動物 (齧歯類) では接触過敏症として知られる化学物質の毒性の一つである。OECD がまとめた Adverse Outcome Pathway (有害性発現経

路、AOP) では、化学物質による皮膚感作は次の 4 つの Key event (KE) からなるとされている。

- KE1: 化学物質とタンパク質のシステイン残基あるいはリジン残基との共有結合
- KE2: ケラチノサイト応答 (細胞防御関連遺伝子の活性化等)
- KE3: 樹状細胞応答 (特異的細胞表面マーカー、炎症性サイトカインの発現等)
- KE4: リンパ節応答 (T 細胞の活性化、増殖等)

LuSens test method は既に OECD TG 442D に登録されている KeratinoSensTM と同様に、上記の KE2 に対応する試験法であり、基本原理は Keap1-Nrf2- ARE pathway (図 1) を利用したレポーターアッセイである。

Keap1-Nrf2- ARE pathway は、転写因子 Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) の抑制因子である Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) および ARE が関係する遺伝子発現経路である。Nrf2 は Keap1 と結合し、ARE に依存して発現する遺伝子群の発現量を制御している。Keap1 のシステイン残基に求電子性の化学物質が結合すると、Nrf2 は Keap1 から解離し、核内へ移行して DNA 上の ARE に結合する。その結果、下流の遺伝子群の発現が誘導され、化学物質による障害から細胞を保護するために機能する。多くの皮膚感作性物質が Keap1-Nrf2-ARE pathway を活性化することが知られており^{4,5)}、*in vitro* 感作性試験法の開発に利用されている。

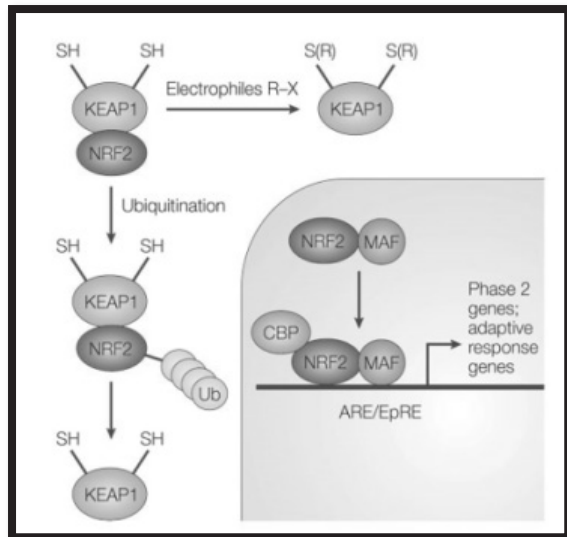


図 1. Keap1-Nrf2-ARE pathway の模式図

KeratinoSensTM⁶⁾ では、Aldo-Keto Reductase Family 1 Member C2 (AKR1C2) 遺伝子の ARE をエンハンサーとす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 HaCaT 細胞 (ヒトケラチノサイト系培養細胞) を用いるのに対し、LuSens test method⁷⁾ ではラットの NADPH:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) 遺伝子由来の ARE をエンハンサーとす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ケラチノサイト系培養細胞 (株名は不詳) を試験に使用する。

いずれの方法も化学物質による Keap1-Nrf2-ARE pathway の活性化に伴って誘導されるルシフェラーゼの活性を、基質を添加して発光強度を測定することにより、化学物質の皮膚感作性を評価する方法である。

3. 試験手順／判定

LuSens test method を実施するうえでのプロトコルは EURL ECVAM のデータベース (DB-ALM) より、遺伝子組み換え培養細胞株 (LuSens) は BASF 社よりそれぞれ提供されている。ルシフェラーゼレポーター遺伝子検査は、既に同 TG に記載されている KeratinoSens™ と同様に、①発光検出試薬は Promega 社から購入し、②レポーター遺伝子として利用されている改変ルシフェラーゼ遺伝子 (Luc2) の使用に際しては、特許権者である Promega 社とライセンス契約を必要とする。

3-1. 遺伝子改変細胞の準備および調製

ARE 制御下のルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定的に取り込んだトランスジェニック細胞系を用いる。細胞の受領後、標準プロトコルで指定された継代数の細胞 (1 から 3 代) を増殖し、主ストック細胞として凍結保存する。主ストック細胞から増殖させた細胞は、指定された継代数 (20 代) 以内で試験に使用する。細胞培養培地は標準プロトコルに記載されているように基礎培地 (例: Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)) に成長因子と抗生物質として Penicillin/Streptomycin および Puromycin を加えたものを使用する。しかし、検査実施中の細胞には抗生物質は使用しない。実験には、継代の時も含め 1 度も 100%コンフルエントになった事がない細胞を、80~90%コンフルエントの状態を用いる。実験前日に、培養フラスコから調製した均一な細胞懸濁液を 96 ウェルプレートに播種 (10,000 cells/well) する。96 ウェルプレートへの播種時には、ウェル間の細胞数に偏りが出ないように、調製した細胞懸濁液が常に均一となるように留意する。ルシフェラーゼ活性測定および細胞生存性検査では、濃度毎に 3 ウェルを実施する。

3-2. 被験物質の調製および濃度設定手順

被験物質および対照物質ともに原則として実験当日の調製とする (安定的に凍結保存されている液体は実験当日に溶解する)。被験物質はジメチルスルホキシド (DMSO, CAS No. 67-68-5) 等の適切な媒体に溶解して、最高濃度 (例: 200 mM) の溶液を調製する (DMSO はそれ自体が滅菌状態にあると考える)。DMSO に不溶の場合は、滅菌精製水あるいは培養液にて同様に調製し、その溶液は、滅菌 (例えば濾過) する。分子量が不明の被験物質の場合、200 mg/mL あるいは 20% (w/v) の溶液とする。DMSO、滅菌水あるいは培養液以外の媒体を使用した場合は、その科学的な妥当性を明記する。

これらの溶液を DMSO (不溶の場合は滅菌水または滅菌培養液) で倍々希釈して 12 段階の濃度 (0.098~200 mM) 溶液を調製する。これを血清含有培養液で 25 倍希釈する。これらの調製溶液を各ウェルに加え、最終濃度を 0.98~2000 μ M とする。分子量が不明の被験物質の場合、段階希釈は DMSO もしくは適切な媒体で実施し、最終濃度を

0.98~2000 µg/mL とする。

濃度設定のための細胞毒性検査は上記に記載された濃度を基に実施し、細胞生存率が 75%となる濃度 (CV₇₅) を決定するために実施する。CV₇₅はルシフェラーゼ活性測定および並行して実施される細胞毒性検査における濃度設定の際に使用される (例: 公比 1.2 で設定した濃度群において、CV₇₅ より 1 濃度高い濃度 (CV₇₅×1.2)、CV₇₅、CV₇₅ の下 4 濃度 (CV₇₅/1.2, CV₇₅/1.44, CV₇₅/1.73, CV₇₅/2.07))。細胞毒性が強すぎる、弱すぎる、もしくは溶解性が著しく低い被験物質の場合は、正当な理由に基づき代替の濃度が使用される。

媒体対照 (例: DMSO) は、検査毎に 1 プレートあたり十分なウェル数を同様に調製する (例: 標準プロトコルに準じ、細胞毒性検査では 12 ウェル、ルシフェラーゼ活性測定では 24 ウェル)。媒体は被験物質や陽性対照物質と同様に希釈を行い (例: 1%)、細胞生存率に影響を及ぼさないようにする。

陰性対照も検査毎に 1 プレートあたり十分なウェル数を同様に調製する (例: 標準プロトコルに準じ、細胞毒性検査では 3 ウェル、ルシフェラーゼ活性測定では 6 ウェル)。

LuSens test method では、陰性反応が得られる事が既知の非感作性物質の DL-Lactic acid (CAS No. 50-21-5, ≥99%) を 5000 µM (もしくは 450 µg/mL) にて用いる。上記以外の陰性対照物質についても十分な背景データがある場合には使用可能とする。また、十分なウェル数の培養液のみを細胞に添加した無処理区画を同様に調製する (例: 標準プロトコルに準じ、細胞毒性検査では 6 ウェル、ルシフェラーゼ活性測定では 12 ウェル)。

LuSens test methodが適切に実施されているかを確認する目的で、陽性対照を検査毎に 1 プレートあたり十分なウェル数を同様に調製する (例: 標準プロトコルに準じ、細胞毒性検査では 2 ウェル、ルシフェラーゼ活性測定では 5 ウェル)。LuSens test methodでは、120 µM Ethylene Glycol Dimethacrylate (EGDMA, CAS No. 97-90-5, ≥99%) を被験物質と同様の希釈方法にて適用する。120 µM にて細胞毒性がみられる、もしくは陽性反応がみられない場合は、細胞毒性がみられない (細胞生存率が70%以上) もしくは陽性反応がみられる濃度を使用する。上記以外の陽性対照物質についても十分な背景データがある場合には使用可能とする。

3-3. 被験物質および対照物質の適用

各被験物質および陽性対照物質について、1 プレート毎に 3 ウェルずつ、独立した少なくとも 2 回の繰り返し検査 (各被験物質および陽性対照物質について n = 6) を実施する。独立した 2 回の検査結果が不一致の場合、3 回目の検査を実施し、それぞれ合計で n = 9 とする。各検査は別日に同じ継代細胞を用いるが、各実験は新たな被験物質調製液および細胞を用いて別日に行う。

細胞を播種した 24 時間培養後のプレートの培養液を捨て、1 ウェルあたり 150 µL の血清含有培地 (抗生物質不含) で置き換える。調製した被験物質溶液等を 50 µL ずつ各ウェルに加え、48 時間、37 ± 1°C、5%CO₂ インキュベータ内で培養する。ただし、1 ウェルは無処置 (無細胞、空ウェル) とする。ウェルからの蒸発や交差汚染を避けるためにプレートごとに遮蔽する。

3-4. ルシフェラーゼ活性の測定

適切なルシフェラーゼ活性の測定には、1) 感度の良いルミノメーター、2) 光の交差による測定の妨害を防ぐに十分なウェルの高さを持ったプレート、3) 十分な感度とばらつきの低い測定値を得るためのルシフェラーゼ基質の選択、および4) 適切かつ安定した背景値が重要である。これらを確認するために TG 442D Appendix 1B-Annex 3 に示されたセットアップ方法を試験前に確認することを勧める。

培養終了後、上清を捨て、リン酸緩衝化生理食塩水で一度洗う。細胞溶解用緩衝液を各ウェルに加え、暗所で 10～20 分間処理する。細胞溶解物を含むプレートを標準プロトコルに従って処理し、ルミノメーターで測定する。

3-5. 細胞生存率の測定

LuSens test method における細胞生存率の測定は、培養終了後に培地を 0.5 mg/ml の MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue tetrazolium bromide; CAS No. 298-93-1) 含有新鮮培地に交換する。細胞は 2 時間、 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ インキュベータ内で培養する。培養後、MTT 含有培地を捨て、10% SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) 溶液などで一晩細胞溶解後、600 nm の吸光度を測定する。

3-6. データの解析

LuSens test method では、以下の指標を算出する。

- ・被験物質および陽性対照で観察されたルシフェラーゼ活性の最大誘導倍率
- ・被験物質の 75%生存率 (CV₇₅)

ルシフェラーゼ活性が 1.5 倍以上の被験物質各濃度について、ルシフェラーゼ活性の誘導が統計学的に陰性対照に対して有意 ($p < 0.05$, two-tailed Student's *t*-test) であるかを検証する。さらに、上記の濃度において細胞毒性がみられないことを確認する。グラフを作成して視覚的に確認することも推奨される。明らかな濃度依存性が認められない場合や濃度反応曲線が二相性を示す場合には、測定を繰り返し、被験物質特異的か、測定エラーなのか、などを確認する。二相性であることが確認できた場合は、低い方の EC_{1.5} 値を選択する。

3-7. 試験成立の条件

LuSens test method においては、以下の 3 条件をすべて満たす場合に成立する。

- ・陽性対照物質の 120 μM EGDMA (もしくはそれと同等の濃度) において、平均のルシフェラーゼ活性が 2.5 以上かつ細胞生存率が媒体対照群と比較して 70%以上でなくてはならない。
- ・陰性対照物質 (例: 5000 μM DL-Lactic acid) および無処置区画において平均のルシフェラーゼ活性が媒体対照と比較して 1.5 より低くなくてはならない。
- ・プレート間の媒体対照の平均変動係数が 20%以下でなくてはならない。
- ・少なくとも被験物質 3 濃度の細胞生存率が媒体対象群と比較して 70%以上でな

ればならない。さらに、結果が陰性の場合、少なくとも 1 濃度の細胞生存率は 70% より低くなければならない。

3-8. 陽性の判定

2 回の繰り返し実験の 2 回あるいは 3 回の繰り返し実験の 2 回で、以下の条件に合致した場合に被験物質は感作性物質と判断する。そうでない場合は、陰性と判断する。

- ・連続した細胞毒性のない（細胞生存率が 70%以上）被験物質 2 濃度においてルシフェラーゼ活性が媒体対照と比較して 1.5 倍以上で、媒体対照と比較して統計学的に有意であること。上記を満たすためには少なくとも被験物質 3 濃度において細胞毒性がない必要がある。

上記に加え、2000 μ M（分子量未知の場合は 2000 mg/mL）でも検査間のばらつきなく陰性で、細胞毒性もみられない場合、その結果は評価不能とする。

4. 精度

本試験法の技術移転性、施設内再現性、施設間再現性については、BASF 社によるインハウス試験、および外部 4 施設が参加したバリデーション研究において検討され、EURL ECVAM によって評価されている^{2,3,7,8)}。

4-1. 技術移転性^{2,8)}

8 物質を用いて、主導施設の BASF 社から Bureson Research Technologies 社、DSM Nutritional Products 社、Institute for In Vitro Sciences (IIVS) および The Procter & Gamble 社の 4 施設への技術移転性について評価が行われた (Phase I)。4 施設のうち 2 施設は KeratinoSensTM のバリデーション研究にも参加していた。技術移転性の基準は、

- (1) 8 物質中 6 物質以上で正しい判定結果が得られること
- (2) Validity criteria を満たす試験結果の割合が全体の 70%以上であること

とされた。1 施設は開発者である BASF 社で試験法を習得し、3 施設は SOP の提供だけで試験を実施した。

結果を表 1-1 に示す。全ての施設で上記 (1)、(2) の基準を満たしており、技術移転性に問題は無いと考えられた。但し、陽性対照物質である EGDMA に関しては、その細胞毒性により細胞生存率が 60%未満となる場合があったため、以降のバリデーション研究 (Phase II) では、Validity criteria として陽性対照物質を添加した際の細胞生存率が 70%以上であることが追加された。

表 1-1. 技術移転性に関する試験結果

Lead lab						
	Human/LLNA data	Results				Final
		Positive	Negative	invalid		
α -Hexyl-cinnamic aldehyde	+	5	0	0		+
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	+	4	1	0		+
Chlorobenzene	-	0	4	0		-
Citral	+	2	0	1		+
DL-Lactic acid	-	0	2	1		-
Ethylene glycol dimethacrylate	+	3	0	0		+
Methyl salicylate	-	2	0	1		+
Sulfanilamide	-	2	2	0		?
		Total repetitions	30			6/8
		Valid repetitions (%)	90			
Lab 1						
	Human/LLNA data	Results				Final
		Positive	Negative	invalid		
α -Hexyl-cinnamic aldehyde	+	2	2	0		?
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	+	3	0	0		+
Chlorobenzene	-	0	2	0		-
Citral	+	4	0	0		+
DL-Lactic acid	-	0	4	0		-
Ethylene glycol dimethacrylate	+	3	0	0		+
Methyl salicylate	-	2	0	0		+
Sulfanilamide	-	0	2	0		-
		Total repetitions	24			6/8
		Valid repetitions (%)	100			
Lab 2						
	Human/LLNA data	Results				Final
		Positive	Negative	invalid		
α -Hexyl-cinnamic aldehyde	+	2	0	1		+
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	+	3	0	0		+
Chlorobenzene	-	2	2	0		?
Citral	+	2	0	0		+
DL-Lactic acid	-	0	2	0		-
Ethylene glycol dimethacrylate	+	2	0	0		+
Methyl salicylate	-	2	1	0		+
Sulfanilamide	-	0	2	0		-
		Total repetitions	21			6/8
		Valid repetitions (%)	95			
Lab 3						
	Human/LLNA data	Results				Final
		Positive	Negative	invalid		
α -Hexyl-cinnamic aldehyde	+	2	1	2		+
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	+	3	1	1		+
Chlorobenzene	-	0	3	1		-
Citral	+	4	0	0		+
DL-Lactic acid	-	1	3	0		-
Ethylene glycol dimethacrylate	+	3	0	1		+
Methyl salicylate	-	3	0	1		+
Sulfanilamide	-	0	3	1		-
		Total repetitions	34			7/8
		Valid repetitions (%)	79			
Lab 4						
	Human/LLNA data	Results				Final
		Positive	Negative	invalid		
α -Hexyl-cinnamic aldehyde	+	2	1	2		+
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	+	4	0	1		+
Chlorobenzene	-	0	4	1		-
Citral	+	4	0	1		+
DL-Lactic acid	-	0	5	0		-
Ethylene glycol dimethacrylate	+	3	0	2		+
Methyl salicylate	-	0	3	2		-
Sulfanilamide	-	0	3	2		-
		Total repetitions	40			8/8
		Valid repetitions (%)	73			

4-2. 施設内再現性^{2,7,8)}

BASF 社によるインハウス試験では、74 物質中 69 物質 (93%) で再現性がみられた^{2,7)}。

3 機関によるバリデーション研究では、性能標準⁹⁾に記載されている 20 物質の内から 12 物質が選択され、施設内再現性が評価された。3 機関とも施設内再現性は 100%であり、性能標準に記載されている 80%以上という基準を満たしていた (表 1-2)^{2,8)}。ただし、ヒト/LLNA データと比較すると、4-Methoxy-acetophenone は偽陽性、Phenyl benzoate は偽陰性である。なお本委員会では、用いられた 20 物質および 12 物質の Chemical class、Mechanism、感作性カテゴリー、Pro/ prehapten に関する情報から、これらの物質は適切に選択されたものと判断した。

表 1-2. 施設内再現性に関する試験結果²⁾

test substances	Lead Lab			Laboratory 1			Laboratory 2		
	Exp1	Exp2	Exp3	Exp1	Exp2	Exp3	Exp1	Exp2	Exp3
2,4-Dinitrochlorobenzene	+	+	+	+	+	+	+ [#]	+	+
4-methoxy-acetophenone	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4-Nitrobenzylbromide	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citral	+	+	+	+ [#]	+	+	+ [#]	+	+
Ethylene glycol dimethacrylate	+	+	+	+ [#]	+	+	+ [#]	+	+
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isoeugenol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Isopropanol	-	-*	-	-	-	-	-	-	-
Methyldibromo glutaronitrile	+	+	+	+	+	+	+	+	+
para-phenylenediamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenyl benzoate	-	-	-	-	-*	-	-*	-	-
Salicylic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: positive/skin sensitiser prediction; -: negative/non-sensitiser prediction; #experiments conducted in the transferability phase; *experiments with three repetitions.

4-3. 施設間再現性^{2,8)}

性能標準⁹⁾に記載されている 20 物質を用いて施設間再現性が評価された。12 物質に関しては、前述の 3 施設 (Lead lab、Lab 1 および Lab 2) の施設内再現性評価の際の結果が用いられた。残りの 8 物質に関しては Lead lab、Lab 3 および Lab 4 の 3 施設で試験を実施した。また Lab 3、Lab 4 の 2 施設はさらに 5 物質の試験を実施した。

結果を表 1-3 に示す。全ての物質で施設間再現性は 100%であり、性能標準に記載されている 80%以上という基準を満たしていた。ただし、ヒト/LLNA データと比較すると、4-Methoxy-acetophenone および Methyl salicylate は偽陽性、Phenyl benzoate は偽陰性である。

表 1-3. 5 施設によるバリデーション研究結果²⁾

test substance	LLNA reference		Lead lab	Lab1	Lab2	Lab3	Lab4
	NS vs S	LLNA potency					
4-methoxy-acetophenone	NS	na	+	+	+	nt	nt
Chlorobenzene	NS	na	-	nt	nt	-	-
Glycerol	NS	na	-	-	-	-	-
Isopropanol	NS	na	-	-	-	-	-
Lactic acid	NS	na	-	nt	nt	-	-
Methylsalicylate	NS	na	+	nt	nt	+	+
Salicylic acid	NS	na	-	-	-	-	-
Sulfanilamide	NS	na	-	nt	nt	-	-
2-Mercaptobenzothiazole	S	moderate	+	nt	nt	+	+
2,4-Dinitrochlorobenzene	S	extreme	+	+	+	+	+
4-Methylaminophenolsulfate	S	strong	+	nt	nt	+	+
4-Nitrobenzylbromide	S	extreme	+	+	+	nt	nt
Citral	S	moderate	+	+#	+	nt	nt
Ethylene glycol dimethacrylate	S	weak	+	+#	+	nt	nt
Eugenol	S	weak	+	nt	nt	+	+
Isoeugenol	S	moderate	+	+	+	nt	nt
Methyldibromoglutaronitrile	S	strong	+	+	+	+	+
Oxazolone	S	extreme	+	nt	nt	+	+
para-phenylenediamine	S	strong/extreme	+	+	+	nt	nt
Phenyl benzoate	S	weak	-	-	-	nt	nt
Predictivity							
n			20	12	12	13	13
sensitivity (%)			91.7	87.5	87.5	100.0	100.0
specificity (%)			75.0	75.0	75.0	85.7	85.7
PPV (%)			84.6	87.5	87.5	85.7	85.7
NPV (%)			85.7	75.0	75.0	100.0	100.0
accuracy (%)			85.0	83.3	83.3	92.3	92.3

NS: non-sensitiser; S: sensitiser; na: not applicable; +: positive/skin sensitiser prediction; -: negative/non-sensitiser prediction; nt: not tested; #experiment conducted in the transferability phase.

5. 正確度（感度および特異度）^{2,3,7,8,9)}

BASF 社による 74 物質を用いたインハウス試験の結果^{2,7,8)}、および 5 施設によるバリデーション研究の結果（表 1-3）^{2,9)}から、感度、特異度および正確度が評価された。

BASF 社によるインハウス試験においては、ヒトデータ（69 物質）と比較した場合、感度は 83%、特異度は 78%、正確度は 81%、LLNA データ（72 物質）と比較した場合、感度は 75%、特異度は 71%、正確度は 74%であった（なおインハウス試験結果⁷⁾ およびその改訂結果⁸⁾とも本文中の数値が表の内容と一致しなかったため、これらの正確度の数値は表の記載から本委員会により計算された）。本試験法の感度は 83%（ヒト）、75%（LLNA）であり、陰性の結果が得られた場合は偽陰性の可能性を考慮し、本試験法のみで皮膚感作性を陰性と判定することはできない。さらに偽陰性となった 13 物質中 2 物質（Phthalic anhydride 及び Propyl gallate）は UN GHS 1A に区分される物質であったことに特に注意する必要がある。

また、特異度も 78% (ヒト) と 71% (LLNA) であることから、本試験法で陽性の結果が得られた場合にも、偽陽性の可能性があることに留意しなければならない。

Phthalic anhydride はアシル基転移剤であり⁷⁾、リジン残基特異的に結合することが知られているため、Keap1-Nrf2-ARE pathway の活性化を指標とする本試験法では偽陰性になったと考えられる。Propyl gallate については Prohaptan の一種である Pro Michael acceptor であり⁷⁾、代謝されないとタンパクと結合しないため偽陰性になったと考えられる。その他の偽陰性物質については、アシル基転移剤 (Benzoyl peroxide および Phenyl benzoate)、Pro/prehaptan (4-Allylanisole, Ethylene diamine および Resorcinol)、システイン残基と共有結合しない金属イオン (Nickel chloride) などの理由が考えられた。一方、偽陽性物質については、光感作性物質として知られている 6-Methylocoumarin が Michael acceptor としてタンパク質と結合する可能性がある以外、不明であった。

5 施設によるバリデーション研究 (表 1-3) においては、感度は 88-100%、特異度は 75-86%、正確度は 83-92%であった。ただし、試験に用いた検体のサブセットは施設によって異なっている。Lab 3 および Lab 4 の感度および特異度が他施設より高いのは、他施設の試験において偽陰性となった Phenyl benzoate および偽陽性となった 4-Methoxy-acetophenone の試験を実施していないためと考えられる。20 物質全ての試験結果をまとめると、感度は 92%、特異度は 75%、正確度は 85%であった。性能標準¹⁰⁾ では、これら 20 物質を用いた評価において、感度、特異度および正確度が 80%以上という基準が示されている。本試験法の感度および正確度は 80%以上であったが、特異度はこの基準を満たさなかった。特異度が 80%未満だったのは非感作性物質 8 品のうち 2 品が偽陽性になったためであり、本試験法の特異度を判断するためにはこの被験物質数では不十分と考えられたものの、本試験法において陽性の結果が得られた場合には、偽陽性の可能性があることに留意しなければならない。

上記 20 物質の本試験法と KeratinoSensTM の VRM (Validated Reference Method) による比較試験結果を表 2-1 に示す。両試験法とも 20 物質中 17 物質を正しく判定しており、正確度は 85%であった。本試験法で偽陽性となった Methyl salicylate は、KeratinoSensTM では陰性と判定され、本試験法で陽性と判定された Eugenol は KeratinoSensTM では偽陰性となった。ESAC opinion³⁾ では、両試験法のバリデーション研究結果の詳細が確認されており、この 2 物質については両試験法ともに陽性と判定された個別の実験 (run) と陰性と判定された個別の実験があったこと、すなわちこの 2 物質は判定の難しい物質であると記載されている (表 2-2)。両試験法で偽陰性となった Phenyl benzoate は Weak sensitizer である。また 4-Methoxy-acetophenone は両試験法で偽陽性となった。これらの結果から、ESAC opinion では両試験法についてどちらか一方を推奨する科学的な根拠はないと評価されており、両試験法の予測性はほぼ同等と考えられる。

以上より、本試験法単独では皮膚感作性の予測性は不十分であり、証拠の重み付けや他の試験法と組み合わせでの評価を推奨する。

表 2-1. LuSens test method と KeratinoSens™ との比較-1²⁾

test substance	LLNA reference result		LuSens	KeratinoSens
	NS vs S	LLNA potency		
4-methoxy-acetophenone	NS	na	+	+
Chlorobenzene	NS	na	-	-
Glycerol	NS	na	-	-
Isopropanol	NS	na	-	-
Lactic acid	NS	na	-	-
Methylsalicylate	NS	na	+	-
Salicylic acid	NS	na	-	-
Sulfanilamide	NS	na	-	-
2-Mercaptobenzothiazole	S	moderate	+	+
2,4-Dinitrochlorobenzene	S	extreme	+	+
4-Methylaminophenolsulfate	S	strong	+	+
4-Nitrobenzylbromide	S	extreme	+	+
Citral	S	moderate	+	+
Ethylene glycol dimethacrylate	S	weak	+	+
Eugenol	S	weak	+	-
Isoeugenol	S	moderate	+	+
Methyldibromo glutaronitrile	S	strong	+	+
Oxazolone	S	extreme	+	+
para-phenylenediamine	S	strong/extreme	+	+
Phenyl benzoate	S	weak	-	-
Total n			20	20
Sensitivity			91.7	83.3
Specificity			75.0	87.5
PPV			84.6	90.9
NPV			85.7	77.8
Accuracy			85.0	85.0

NS: non-sensitiser; S: sensitiser; +: positive/skin sensitiser; -: negative/non-sensitiser.

表 2-2. LuSens test method と KeratinoSens™ との比較-2³⁾

Performance Standards Reference Substances		KeratinoSens™					LuSens				
		Lead Lab	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lead Lab	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4
4-Methoxy-acetophenone	Non-sensitiser	(P-P-P-P)					(P-P) (P-P) (P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)		
Glycerol	Non-sensitiser	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N) (N-N) (N-N)	(N-N) (N-N) (N-N)	(N-N) (N-N) (N-N)	(N-N)	(N-N)
Isopropanol	Non-sensitiser	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N) (N-P-N) (N-N)	(N-N) (N-N) (N-N)	(N-N) (N-N) (N-N)	(N-N)	(N-N)
Salicylic acid	Non-sensitiser	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N) (N-N) (N-N)	(N-N) (N-N) (N-N)	(N-N) (N-N) (N-N)	(N-N)	(N-N)
Chlorobenzene	Non-sensitiser	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N-N)	(P-N-N)	(P-N-N)			(N-N)	(N-N)
Lactic acid	Non-sensitiser	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N-N)	(P-N-N)			(N-N)	(N-N)
Methyl salicylate	Non-sensitiser	(N-N-N)	(P-N-N)	(N-N-N)	(P-N-N)	(P-N-N)	(N-P-P)			(P-P)	(P-P)
Sulphanilamide	Non-sensitiser	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N-N)	(P-N-N)	(N-N-N)	(N-N)			(N-N)	(N)
Ethylene glycol dimethacrylate	Skin sensitiser (weak)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)		
Phenyl benzoate	Skin sensitiser (weak)	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N-N)	(N-N-P)	(N-N) (N-N) (N-N)	(N-N-N) (P-N-N) (N-N)	(P-N-N) (N-N) (N-N)		
Citral	Skin sensitiser (moderate)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)		
Isoeugenol	Skin sensitiser (moderate)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)		
Methyldibromo glutaronitrile	Skin sensitiser (strong)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)	(P-P)	(P-P)
para-Phenylenediamine	Skin sensitiser (strong/extreme)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)		
2,4-Dinitrochlorobenzene	Skin sensitiser (extreme)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)	(P-P)	(P-P)
4-Nitrobenzylbromide	Skin sensitiser (extreme)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)	(P-P) (P-P) (P-P)		
Eugenol	Skin sensitiser (weak)	(P-N-N)	(P-N-N)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-N-N)	(N-P-P)			(P-P)	(P-P)
2-Mercaptobenzothiazole	Skin sensitiser (moderate)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P)			(P-P)	(P)
4-Methylaminophenol sulphate	Skin sensitiser (strong)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P)			(P-N-P)	(P-P)
Oxazolone	Skin sensitiser (extreme)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P-P)	(P-P)			(P-P)	(P-P)

P = Positive run

N = Negative run

() = Tested in addition to what is requested in the performance standards (PS)

() brackets correspond to an experiment, e.g., for experiment (N-P-P) the final conclusion is P.

In bold face are the 12 reference substances for which, according to the PS, WLR information needs to be generated. BLR information in turn, is required for all 20 reference substances.

6. 評価可能な物質の範囲および有用性と限界

本試験法は、さまざまな構造や物理化学的性質を有する化学物質に適用可能であることが示されている⁷⁾。また、本試験法に用いる溶媒に溶解する、もしくは安定に分散する化合物は適用可能であるが、適用可能最高濃度においても細胞毒性がみられない場合（細胞生存率 70%以上）の陰性結果は「評価不能」とされる。

本試験法は KE2 を評価する *in vitro* 試験法である KeratinoSens™ と同様、システイン残基との反応が必要な Keap1-Nrf2-ARE pathway の活性化を指標としており、リジン残基特異的に結合し、感作性を示す物質は偽陰性と判定されることが考えられるため、そのような物質（例えば、UN GHS 1A の Phthalic anhydride）の陰性結果は注意が必要である⁷⁾。本試験法

に使用する細胞株の代謝能は限定的であり¹¹⁾、本試験条件からも、プロハプテンおよびブレハプテン（例えば、UN GHS 1A の Propyl gallate）は陰性となる可能性がある。一方、感作性のないケミカルストレスサー（例えば酸化ストレスを誘導する物質）は KeratinoSensTMと同様、偽陽性となる可能性がある¹²⁾。さらに、ルシフェラーゼ活性に干渉する化学物質も評価に影響する可能性がある¹³⁾。

本試験法は、細胞培養の技術と 96 ウェル対応のルミノメーターの使用技術があれば容易に実施可能である。LuSens test method はケラチノサイトにおける ARE-dependent pathway による遺伝子発現を指標にした検査法であることから、同様に Keap1-Nrf2-ARE pathway を利用したレポーターアッセイである KeratinoSensTMと基本的な操作は同様である。本試験法の実施に必要なランニングコストは KeratinoSensTMと同様約 1.5 万円と見積もられ、LLNA（同約 10 万円）より低額であり、h-CLAT（同約 2 万円）や U-SENSTM（同約 1.8 万円）とほぼ同程度であった。本試験法の場合、開発元の BASF 社より細胞株の入手が無償で可能である（輸送費など実費別）。一方、KeratinoSensTMでは現在は細胞株の入手に関して販売を委託された acCELLerate 社より 500 ユーロで購入可能である（実費別）。両試験法とも細胞の入手に関して開発元とのライセンス契約は不要である。

本試験法は、IATA において他の試験法と組み合わせることにより、感作性物質と非感作性物質との識別に使用することが可能である。しかし、本試験法単独での感作性強度分類や GHS のサブカテゴリー分類への応用には適さない。

7. 結論

LuSens test method は、既に OECD TG 442D に登録されている KeratinoSensTMと同様に、感作性発現機序における KE2 に対応する試験法である。

KeratinoSensTMでは、AKR1C2 遺伝子の ARE をエンハンサーとす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 HaCaT 細胞（ヒトケラチノサイト系培養細胞）を用いるのに対し、LuSens test method ではラットの NQO1 遺伝子由来の ARE をエンハンサーとす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ケラチノサイト系培養細胞（株名不詳）を使用する。いずれも化学物質による Keap1-Nrf2-ARE pathway の活性化に伴って誘導されるルシフェラーゼの活性を、基質を添加して発光強度を測定することにより、化学物質の皮膚感作性を評価する方法である。

LuSens test method は、EURL ECVAM によるバリデーション研究は行われず、BASF 社によるインハウス試験および外部 4 機関が参加した性能標準に基づくバリデーション研究が行われ、その結果を EURL ECVAM が評価して、2018 年 6 月に OECD TG 442D に追記された（Appendix 1B）。

本試験法は、細胞培養の技術と 96 ウェル対応のルミノメーターの使用技術があれば容易に実施可能である。また、本試験法に用いる細胞株は BASF 社から入手可能である。

BASF 社による 74 物質を用いた施設内再現性は 93%であり、3 機関による施設内再現性（12 物質について）は 100%であった。20 物質を用いて BASF 社を含む 5 施設において少なくとも 1 物質につき 3 施設以上が実施した施設間再現性試験の結果は 100%であった。いずれも性能標準で要求している 80%以上の基準を満たしていた。

BASF 社によるインハウス試験においては、ヒトデータ（69 物質）と比較した場合、感度は 83%、特異度は 78%、正確度は 81%、LLNA データ（72 物質）と比較した場合、感度は 75%、特異度は 71%、正確度は 74%であった。用いた検体のサブセットは施設によって異なっているが、5 施設によるバリデーション研究においては、感度は 88-100%、特異度は 75-86%、正確度は 83-92%であった。

性能標準に記載されている 20 物質を用いて行われた LuSens test method と KeratinoSens™ の比較試験の結果では、両試験法とも 20 物質中 17 物質を正しく判定しており、正確度は 85%であった。両試験法の試験結果の詳細から、ESAC による評価では両試験法についてどちらか一方を推奨する科学的な根拠はないとしている。本委員会は両試験法の予測性はほぼ同等と評価した。

LuSens test method は、KeratinoSens™ と同様にシステイン残基との反応が必要な Keap1-Nrf2-ARE pathway の活性化を指標としており、リジン残基特異的に結合し、感作性を示す物質は偽陰性と判定されることが考えられるので注意が必要である。本試験法に使用する細胞株の代謝能は限定的であり、プロハプテンおよびプレハプテンは陰性となる可能性がある。一方、感作性のないケミカルストレス（例えば酸化ストレスを誘導する物質）は KeratinoSens™ と同様、偽陽性となる可能性がある。さらに、ルシフェラーゼに干渉する化学物質も評価に影響する可能性がある。

以上の結果から、LuSens test method は、IATA において他の試験法と組み合わせることにより、感作性物質と非感作性物質との区別に使用することが可能である。しかし、本試験法単独での感作性強度分類や UN GHS のサブカテゴリー分類への応用には適さない。

本委員会は、上記の本試験法の様々な限界を勘案すると、本試験法単独では皮膚感作性の判定は不十分であり、証拠の重み付けや他の試験法との組合せで用いることを推奨する。

引用文献

- 1) OECD (2018). Key event based test guideline. In vitro skin sensitization assay addressing the AOP key event on keratinocyte activation. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. No. 442D, OECD, Paris. Accessible at: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264229822-en.pdf?expires=1540286232&id=id&accname=guest&checksum=F9DC614E0BBF02D46223C8FCABCFBA5E>
- 2) EURL ECVAM (2018). The LuSens Test Method Validation Study Report. Accessible at: <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2011-10>
- 3) ESAC (2016). ESAC Opinion on the BASF-coordinated Performance Standards-based validation of the LuSens test method for skin sensitization testing. Available at: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC103706/esac_opinion_2016-04_lusens_final.pdf
- 4) Ade N, Leon F, Pallardy M, Peiffer JL, Kerdine-Romer S, Tissier MH, Bonnet PA, Fabre I, Ourlin JC; 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; 107(2):451-60.
- 5) Vandebriel RJ, Pennings JL, Baken KA, Pronk TE, Boorsma A, Gottschalk R, Van Loveren H; Keratinocyte gene expression profiles discriminate sensitizing and irritating compounds. Toxicol

- Sci. 2010; 117(1):81-9.
- 6) Emter R, Ellis G, Natsch A; Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicol Applied Pharmacol*, 2010; 245: 281-290.
 - 7) Ramirez T, Mehling A, Kolle SN, Wruck CJ, Teubner W, Eltze T, Aumann A, Urbisch D, van Ravenzwaay B, Landsiedel R; LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. *Toxicol In Vitro*. 2014; 28(8):1482-97.
 - 8) Kolle SN; Corrigendum to “LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification.” by Ramirez et al., *Toxicol In Vitro*. 2014; Dec; 28(8):1482–97. doi: 10.1016/j.tiv.2014.08. 002
 - 9) Ramirez T., Stein N., Aumann A., Remus T., Edwards A., Norman K.G., Ryan C., Bader J.E., Fehr M., Burlison F., Foertsch L., Wang X., Gerberick F., Beilstein P., Hoffmann S., Mehling A., van Ravenzwaay B., Landsiedel R; 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*. 2016; 32: 278-286.
 - 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) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. ; Xenobiotic metabolizn enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. *Arch Toxicol*. 2013; 87: 1683-1969.
 - 12) 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-ecvamrecommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.
 - 13) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. ; Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry and Biology*. 2010; 17: 646-657.