

評価会議報告書

ARE-Nrf2 Luciferase Test Method
(角化細胞株レポーターアッセイ)

JaCVAM 評価会議

平成 27 年 (2015 年) 4 月 30 日

JaCVAM 評価会議

- 大野泰雄 (運営委員会推薦) : 座長
- 五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部)
- 金子和弘 (日本化学工業協会)
- 篠田和俊 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
- 杉山真理子 (日本化粧品工業連合会)
- 谷川浩子 (日本動物実験代替法学会)
- 西川秋佳 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
- 平賀秀明 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
- 牧 栄二 (日本免疫毒性学会)
- 森田 健 (日本環境変異原学会)
- 山田隆志 (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
- 横関博雄 (日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会)
- 吉田武美 (日本毒性学会)
- 吉田 緑 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部)
- 吉村 功 (座長推薦)
- 渡部一人 (日本製薬工業協会)

任期：平成 26 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

角化細胞株レポーターアッセイ：Antioxidant response element (ARE)-Nrf2¹ Luciferase Test Method（以下、本試験法と記す）は、化学物質の皮膚感作性を予測する試験法であり、従来のモルモットを用いる皮膚感作性試験（OECD TG406）、マウスを用いる局所リンパ節試験（Local Lymph Node Assay (LLNA)、OECD TG429）および LLNA の変法である LLNA:DA (OECD TG442A)ならびに LLNA:BrdU-ELISA (OECD TG442B)と比べ、動物を用いないという特徴を有する。本試験法は、皮膚感作性を有する多くの化学物質が ARE により制御されている遺伝子の発現を誘導することから、この誘導活性を培養細胞を用いて測定することにより、皮膚感作性の有無を予測する試験法である。本試験法のバリデーション研究の結果については、European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM)による第三者評価が終了している¹⁾。JaCVAM 評価会議は、皮膚感作性試験資料編纂委員会により作成された皮膚感作性試験 角化細胞株レポーターアッセイの評価報告書を基に本試験法の妥当性について検討した。

1. 試験法の定義

名称： 角化細胞株レポーターアッセイ：ARE-Nrf2 Luciferase Test Method

代替する対象毒性試験： モルモットを用いる皮膚感作性試験（OECD TG406）およびマウスを用いる局所リンパ節試験 [LLNA (OECD TG429)、LLNA:DA (OECD TG442A)、LLNA:BrdU-ELISA (OECD TG442B)]

試験法の概略： 本試験法は、Nrf2-Keap1²-ARE pathway を利用し、ケラチノサイト由来 ARE-Nrf2 ルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いたレポーターアッセイである¹⁾。

Nrf2-Keap1-ARE pathway は、転写因子 Nrf2、Nrf2 の抑制因子 Keap1 および ARE が関係する遺伝子発現経路である。Nrf2 は Keap1 と結合し、ARE に依存して発現する遺伝子群の発現量を制御している。Keap1 のシステイン残基に求電子性の化学物質が結合すると、Nrf2 は Keap1 から解離し、核内へ移行して DNA 上の ARE に結合する。その結果、下流の遺伝子群の発現が誘導され、化学物質による障害から細胞を保護するために機能する。皮膚感作性を有する多くの化学物質が Nrf2-Keap1-ARE pathway を活性化することが知られている。

本試験法では、AKR1C2 遺伝子（樹状細胞において皮膚感作性物質により発現誘導される遺伝子の 1 つ）の ARE を融合させた SV40 プロモーターを有するルシフェラーゼ遺伝子のプラスミドを安定的に導入した HaCaT 細胞（ヒトケラチノサイト由来培養細胞株）を用いる。化学物質により Nrf2-Keap1-ARE pathway が活性化されるとルシフェラーゼ遺伝子が発現する。基質を添加してルシフェラーゼが触媒する反応の発光強度を測定することにより、化学物質の皮膚感作性が評価される。

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

² Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1

2. 評価に用いた資料および評価内容の科学的妥当性

本試験法は、KeratinoSens^{TM3}を用いて実施されたバリデーション研究²⁻⁵⁾とそれに続く EURL ECVAM Scientific Advisory Committee により独立した第三者評価が実施され¹⁾、皮膚感作性試験の代替法として科学的に妥当であると報告されている。本邦においては、JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会が、本試験法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、公開されている情報¹⁻⁵⁾を基に評価した。評価の結果、本試験法は、皮膚感作性を有する多くの化学物質が ARE により制御されている遺伝子の発現を誘導するという皮膚感作性発現機序における重要なイベントを検出しており、皮膚感作性試験の代替試験法として原理的妥当性があると考えられた⁶⁾。

なお、再現性を検討したバリデーション試験において被験物質選択に偏りがあり、施設内・施設間再現性には留意すべきであると評価会議は判断した。

3. 本試験法の有用性と適用限界

本試験法は、ヒトケラチノサイト由来培養細胞株を用いる *in vitro* 試験法で、3Rs の精神に合致している。また、1 被験物質当たりのランニングコストも、マウスを用いる LLNA と比較して 1/7 程度で実施可能であり、試験期間も LLNA より短期間であることから、本試験法は簡便性および経済性の面から有用といえる。更に、皮膚感作性を有する多くの化学物質が ARE により制御されている遺伝子の発現を誘導することから、本試験法は、この誘導活性を培養細胞を用いて測定することにより、皮膚感作性の有無を予測するものであり、化学物質の感作性を判断する上で重要な情報を与える。

しかしながら、現時点でこの試験に使用できる細胞系は KeratinoSensTMのみであり、使用には細胞系を樹立した Givaudan 社からライセンスを取得することが必要であり、費用も含めて利用可能な条件の詳細は不明である。一方、KeratinoSensTMを使用しない場合は、OECD 作成の本試験法に関する Performance Standard (案)⁷⁾に従い、妥当性を示さなければならない。また、LogP が 7 以上の強疎水性物質は、DMSO と水への溶解特性から試験に適用できない。酸無水物は、リジン残基と反応性を示す特徴があり、システイン基との反応が必要な Nrf2 pathway を誘導しないため、偽陰性と判定される可能性がある。ルシフェラーゼ酵素に干渉する化学物質では、ルシフェラーゼ活性を正しく測定することができないため注意が必要である。酸化反応や酸化的脱アミノ反応を必要とする多くのプレハプテンは正しく判定されるが、シトクロム P450 による活性化を必要とするプロハプテンは検出できない。培養細胞を用いる試験系のため、細胞毒性の強い物質は適切な濃度で試験ができない場合がある。100 物質以上を評価した報告^{4,5)}における本試験法の感度は、76.7%と 77%であるため、陰性の結果が得られても偽陰性の可能性を考慮する必要がある。また、特異度も、82.1%

³ KeratinoSensTM : Givaudan 社によって樹立されたケラチノサイト由来 ARE-Nrf2 ルシフェラーゼレポーター遺伝子のプラスミドを安定的に導入したヒトケラチノサイト由来培養細胞株

と 79%であることから、陽性の結果が得られた場合にも、偽陽性の可能性があることに留意しなければならない。

4. 目的とする物質又は製品の毒性を評価する試験法としての、社会的受け入れ性および行政上の利用の可能性

社会的受け入れ性：

本試験法は、細胞培養技術および 96 穴プレート用ルミノメーター操作技術を修得していれば容易に実施できる試験である。ただ、現時点で使用できる細胞系は KeratinoSens™ のみであり、販売元である Givaudan 社からライセンスを取得する必要がある。本試験法の実施と結果の解釈に当たっては、化学物質の性質とその適用限界を見極める必要がある。しかし、本試験法は、皮膚感作性を有する多くの化学物質が ARE により制御されている遺伝子の発現を誘導するという皮膚感作性発現機序における重要なイベントを検出しており、化学物質の皮膚感作性を考える上で重要な情報を与えることから、本試験法の社会的受け入れ性は高いものとする。

行政上の利用性：

本試験法で陽性の結果が得られた場合、その化学物質を強い感作性物質である GHS(Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)区分 1 に分類することは行政上可能である。しかしながら、稀に偽陽性の結果が生じることに留意しなければならない。一方、本試験法で陰性の結果が得られた場合、その化学物質の皮膚感作性は偽陰性の可能性があり、本試験法単独でその皮膚感作性を判定することは難しい。本試験法は、その特性を十分に理解した上で、IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment) を構成するその他の情報源と組み合わせて適切に評価することが、行政的な受け入れに必要であるとする。