

評価会議報告書

皮膚感作性試験代替法

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

JaCVAM 評価会議

令和元年（2019年）10月2日

JaCVAM 評価会議

大野 泰雄	(公益財団法人 木原記念横浜生命科学振興財団):座長
五十嵐良明	(国立医薬品食品衛生研究所)
石井 雄二	(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)
稲若 邦文	(日本化学工業協会)
井上 智彰	(日本免疫毒性学会)
今井 教安	(日本動物実験代替法学会)
岩瀬裕美子	(日本製薬工業協会)
久保 文宏	(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)*
中村るりこ	(独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
西川 秋佳	(国立医薬品食品衛生研究所 病理部 / 済生会宇都宮病院)
西村 次平	(独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
沼澤 聡	(日本毒性学会)
平林 容子	(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)
廣田 衛彦	(日本化粧品工業連合会)**
増村 健一	(日本環境変異原学会)
横関 博雄	(日本皮膚免疫アレルギー学会)

任期：平成 30 年 4 月 1 日～令和 2 年 3 月 31 日

*：平成 30 年 4 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日

**：平成 31 年 4 月 1 日～令和 2 年 3 月 31 日

ARE¹-Nrf2² luciferase LuSens test method (以下、本試験法)は、既に経済協力開発機構(OECD)試験法ガイドライン(TG)442Dに登録されている ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSensTM test method (KeratinoSensTM 試験法)と同様に、化学物質の皮膚感作性を予測する試験法である。本試験法は、ケラチノサイトにおける炎症性応答の一つである Keap1-Nrf2-ARE pathway を利用したレポーターアッセイである。本試験法は、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 TG422Dの Performance standards (性能標準)に基づく多施設バリデーション研究が行われ、その結果を EURL ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC)が第三者評価し、2018年6月に OECD TG 442D Appendix 1Bとして追記された。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評価報告書 ARE-Nrf2 luciferase LuSens test method (LuSens test method)¹⁾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：ARE-Nrf2 luciferase LuSens 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 TG 406)およびマウスを用いる局所リンパ節試験 [LLNA (OECD TG 429)、LLNA:DA (OECD TG 442A)、LLNA:BrdU-ELISA or -FCM (OECD TG 442B)]

試験法の概略：本試験法²⁾は、既に OECD TG 442D に登録されている KeratinoSensTM 試験法と同様、Keap1-Nrf2-ARE pathway 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 の抑制因子である Keap1 および ARE が関係する遺伝子発現経路である。Nrf2 と Keap1 の結合は、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^{3,4)}、*in vitro* 感作性試験法の開発に利用されている。

KeratinoSensTM 試験法⁵⁾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、本試験法⁶⁾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。

¹ ARE: Antioxidant response element

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

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、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 機関の参加による性能標準に基づくバリデーション研究が行われ⁶⁻⁸⁾、その結果が ESAC によって評価されている⁹⁾。それらの公表資料を基に、JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会は、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、ESAC の評価結果と同様に、本試験法と KeratinoSensTM 試験法の予測性はほぼ同等と評価している¹⁾。また、同様の原理に基づく試験法である KeratinoSensTM 試験法が科学的に妥当であることは、平成 27 年に JaCVAM 評価会議において既に認められており¹⁰⁾、本試験法も科学的に妥当であると考えられる。

3. 本試験法の有用性と適用限界

本試験法はケラチノサイトにおける ARE 活性化による遺伝子発現を指標にした試験法であることから、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 試験法と基本的な操作は同様である。本試験法における LuSens は開発者より無償提供される。

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⁶⁾。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、KeratinoSensTM 試験法と同様、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偽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 KeratinoSensTM 試験法と同様、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。陰性対照 8 物質および陽性対照 12 物質を用いて 5 施設で実施されたバリデーション研究では、感度 92%、特異度 75%、正確度 85%であり、特異度において性能標準の基準（80%以上）を満たさなかった。従って、本試験法において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。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⁶⁾。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。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。

本試験法は、Integrated Approaches to Testing and Assessment（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を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 Globally Harmonized System of

Classification and Labeling of Chemicals (UN GHS) のサブカテゴリー分類への応用には適さない。

上記の様々な限界を勘案し、本試験法は単独での皮膚感作性の判定には不十分であるが、証拠の重み付けや他の試験法との組合せで用いることにより、化学物質の感作性を判断する上で重要な情報を与える。

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、KeratinoSens™ 試験法同様、細胞培養の技術と 96 ウェル対応のルミノメーターがあれば容易に実施可能である。実施に必要なランニングコストも KeratinoSens™ 試験法と同様、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-SENS™ (同約 1.8 万円) とほぼ同程度であった。さらに本試験法は細胞の入手にあたりライセンス契約を結ぶ必要がなく、輸送費実費負担により細胞株の入手が可能である。本試験法の実施と結果の解釈に当たっては、化学物質の性質と本試験法の適用限界を見極める必要があるが、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。さらに生きた動物を用いないという点で 3Rs の精神に合致していることから、本試験法の社会的受け入れ性は高い。

行政上の利用性：

本試験法は、JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会により、KeratinoSens™ 試験法とほぼ同等の予測性と評価されているため、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 UN GHS 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、KeratinoSens™ 試験法同様、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ても偽陰性の可能性もあり、本試験法単独でその皮膚感作性を評価することは難しい。本試験法は、その特性を十分に理解した上で、IATA 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。

引用文献

- 1) JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会：皮膚感作性試験評価報告書 ARE-Nrf2 luciferase LuSens test method (LuSens test method) (令和元年9月30日)
- 2) 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>
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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
- 8) 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.
- 9) 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
- 10) JaCVAM 評価会議 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) (平成27年4月30日)