

OECDテストガイドラインに準拠した習熟度評価用物質の *in chemico/in vitro*皮膚感作性試験 (OECD TG 442C, OECD TG 442D)の結果

奥富弘子, 稗田紀絵, 福永裕基, 磯江孝治, 小林美和子, 渡辺美香

諸言

欧州連合(EU)では, EU化粧品指令76/768/EECにより2013年3月11日から動物実験を用いて開発された化粧品の販売が全面禁止となっている。こうした海外の動きもあり, 刺激性試験や感作性試験の代替法をはじめとする様々な代替法の開発が進められてきた。

皮膚感作性物質の検出に関しては様々な試験法が開発されているが, 皮膚感作成立における一連の過程がAOP(Adverse Outcome Pathway: 有害性発現経路)としてまとめられ, 4つの主要な事象が上げられている¹⁾。その後, 最初の事象である化学物質とタンパク質との結合能を評価する試験法としてペプチド結合性試験(Direct Peptide Reactivity Assay: DPRA, OECD TG 442C²⁾), 第2の事象であるケラチノサイトの活性化を評価する試験法としてARE-Nrf2 Luciferase Test Method(OECD TG 442D³⁾), 第3の事象である樹状細胞の活性化を評価する試験法としてhuman Cell Line Activation Test(h-CLAT, OECD TG 442E⁴⁾)がOECDテストガイドラインとして採択された。第4の事象であるT細胞の活性化および抗原特異的T細胞の増殖を評価する試験は動物を用いる代替法としてこれまで行われてきたLLNA試験(OECD TG 429⁵⁾, OECD TG 442A⁶⁾, OECD TG 442B⁷⁾)である。しかし, *in vivo*皮膚感作性を単独の動物を用いない試験法のみで評価することは困難であることから, 複数の試験法を組み合わせる必要がある。

我々はすでにh-CLATの受託試験を実施しているが, 実施経験のないDPRAおよびARE-Nrf2 Luciferase Test Methodの受託試験を開始するにあたり, OECDガイドラインに従い, 受託機関としての習熟度を示すために, 習熟度評価用物質を用いてDPRAおよびARE-Nrf2 Luciferase

Test Method試験を実施した。

1. ペプチド結合性試験(DPRA)

本試験は, OECD TG 442CおよびEURL ECVAM DB-ALM, Protocol n°154: Direct Peptide Reactivity Assay(DPRA) for Skin Sensitisation Testing⁸⁾に準拠して実施した。

1.1 試験の原理

DPRAは, システインまたはリジンを含む7個のアミノ酸から成る2種類の合成ペプチドをそれぞれ被験物質と反応させ, 未反応の合成ペプチド量を高速液体クロマトグラフ(HPLC, 測定波長220 nm)で分離定量し, その減少率を求めることによって被験物質の皮膚感作性を予測する試験法である。被験物質の反応性は4段階(High, Moderate, Low, Minimal)に分類される。

1.2 材料および方法

1.2.1 試薬および試液

試薬は, 日本薬局方, HPLC用および特級グレードを用いた。なお, システイン含有ペプチドは, 容易に酸化されるため, 試験に使用するアセトニトリル, 緩衝液, 希釈溶媒は使用前にアルゴンガスで置換した。

1.2.2 習熟度評価用物質溶液の調製

OECD TG 442C, ANNEX 2に記載されている習熟度評価用の10物質(表1)を用いた。それらは, *in vivo*における予測(LLNA結果)において感作物質とされる6物質および非感作物質とされる4物質である。10物質すべてアセトニトリルに溶解するため, アセトニトリルに溶解して習熟度評価用物質溶液(90.3~105 mmol/L)を用時調製した。なお, このアセトニトリルが, 合成ペプチドの安定性に影響しないことを確認した。

1.2.3 陽性対照原液の調製

陽性対照として, *trans*-シンナムアルデヒド

表1 OECD TG 442C ANNEX 2に記載されているペプチド結合性試験の習熟度評価用物質

習熟度評価用物質	CAS No.	分子量	純度 (%)	メーカー	<i>In vivo</i> における予測	DPRAによる予測
1 2,4-ジニトロクロロベンゼン	97-00-7	202.55	99.8	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)	感作物質 (非常に強い [extreme])	陽性
2 オキサゾロン	15646-46-5	217.22	98.4	和光純薬工業 (大阪)	感作物質 (非常に強い [extreme])	陽性
3 ホルムアルデヒド	50-00-0	30.03	36.8	和光純薬工業 (大阪)	感作物質 (強い [strong])	陽性
4 ベンジリデンアセトン	122-57-6	146.19	98.6	和光純薬工業 (大阪)	感作物質 (中程度 [moderate])	陽性
5 ファルネソール	19317-11-4	220.36	96.0	Frinton Laboratories (Hainesport, NJ)	感作物質 (弱い [weak])	陽性
6 2,3-ブタンジオン	431-03-8	86.09	98.9	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)	感作物質 (弱い [weak])	陽性
7 1-ブタノール	71-36-3	74.12	100.0	和光純薬工業 (大阪)	非感作物質	陰性
8 6-メチルクマリン	92-48-8	160.17	99.9	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)	非感作物質	陰性
9 乳酸	50-21-5	90.08	88.7	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)	非感作物質	陰性
10 4-メトキシアセトフェノン	100-06-1	150.17	100.0	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)	非感作物質	陰性

[CAS番号14371-10-9, 分子量132.16, 純度99.1% (GC), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)]を使用し, アセトニトリルに溶解して, 陽性対照原液(100~104 mmol/L)を用時調製した.

1.2.4 合成ペプチド原液の調製

合成ペプチドは, アルギニン(R), フェニルアラニン(F), 4個のアラニン(A)とシステイン(C)またはリジン(K)からなる. システイン含有ペプチド [Ac-RFAACAA-COOH, 純度92.75%, スクラム(墨田区)] およびリジン含有ペプチド [Ac-RFAAKAA-COOH, 純度98.58%, スクラム(墨田区)] はいずれも吸湿しやすいため, 開封時限りの使用とした. システイン含有ペプチドはpH7.5のリン酸緩衝液に溶解し, リジン含有ペプチドはpH10.2の酢酸アンモニウム緩衝液に溶解して, それぞれ0.667 mmol/Lの合成ペプチド原液を習熟度評価用物質との反応の度に調製した.

1.2.5 検量線用ペプチド標準液の調製

システインおよびリジン含有ペプチドの双方について, 標準検量線を作成するため, 合成ペ

プチド原液を希釈溶媒で希釈し, 6濃度(0.534, 0.267, 0.133, 0.0667, 0.0334および0.0167 mmol/L, STD 1~STD 6)の検量線用標準液を調製した. 希釈溶媒は, システイン含有ペプチドではリン酸緩衝液(pH7.5)/アセトニトリル(8:2 v/v), リジン含有ペプチドでは酢酸アンモニウム緩衝液(pH10.2)/アセトニトリル(8:2 v/v)を用いた.

1.2.6 共溶出対照溶液, 基準対照溶液, 陽性対照溶液, 試料溶液の調製

HPLCオートインジェクタ用バイアルを使用し, 共溶出対照溶液, 基準対照溶液A~C, 陽性対照溶液および試料溶液を調製した(表2).

共溶出対照溶液は, 習熟度評価用物質と未反応ペプチドの保持時間が同じになる共溶出によって測定に影響しないことを確認するために用いた. 調製は, 該当する習熟度評価用物質の測定と同日に行った. 基準対照溶液AはHPLCシステム適合性確認, 基準対照溶液Bは分析時間中の合成ペプチドの安定性確認のために用いた. また, 基準対照溶液Cは, 習熟度評価用物質の溶解に用いた溶

表2 各対照溶液および試料溶液の調製方法*

溶液の種類	システイン含有ペプチド用溶液		リジン含有ペプチド用溶液	
	混合溶液	混合量 (μL)	混合溶液	混合量 (μL)
共溶出対照溶液 (習熟度評価用物質 ごと n=1 で調製)	アセトニトリル	200	酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 10.2)	750
	習熟度評価用物質溶液 (約 100 mmol/L)	50	習熟度評価用物質溶液 (約 100 mmol/L)	250
	りん酸緩衝液 (pH 7.5)	750		
基準対照溶液 A (n=3 で調製)	アセトニトリル	250	リジン含有ペプチド原液 (0.667 mmol/L)	750
	システイン含有ペプチド原液 (0.667 mmol/L)	750	アセトニトリル	250
基準対照溶液 B (n=6 で調製)	アセトニトリル	250	リジン含有ペプチド原液 (0.667 mmol/L)	750
	システイン含有ペプチド原液 (0.667 mmol/L)	750	アセトニトリル	250
基準対照溶液 C (n=3 で調製)	アセトニトリル	200	リジン含有ペプチド原液 (0.667 mmol/L)	750
	習熟度評価用物質を溶解した媒体 (アセトニトリル)	50	習熟度評価用物質を溶解した媒体 (アセトニトリル)	250
	システイン含有ペプチド原液 (0.667 mmol/L)	750		
陽性対照溶液 (n=3 で調製)	アセトニトリル	200	リジン含有ペプチド原液 (0.667 mmol/L)	750
	陽性対照原液 (約 100 mmol/L)	50	陽性対照原液 (約 100 mmol/L)	250
	システイン含有ペプチド原液 (0.667 mmol/L)	750		
試料溶液 (習熟度評価用物質 ごと n=3 で調製)	アセトニトリル	200	リジン含有ペプチド原液 (0.667 mmol/L)	750
	習熟度評価用物質溶液 (約 100 mmol/L)	50	習熟度評価用物質溶液 (約 100 mmol/L)	250
	システイン含有ペプチド原液 (0.667 mmol/L)	750		

*記載順に添加した。

媒がペプチド減少率に影響を与えないことを確認するために用いた。

1.2.7 試験方法

システイン含有ペプチドおよびリジン含有ペプチドの試験は、それぞれ別の日に実施した。両ペプチドの試験ともに1日に2~4の習熟度評価用物質を試験に用いた。

検量線用ペプチド標準液、共溶出対照溶液、基準対照溶液A~C、陽性対照溶液および試料溶液を $25 \pm 2.5^\circ\text{C}$ でインキュベートした。HPLC分析前に沈殿や相分離が観察された場合、必要に応じてバイアルを低速 (100~400 xg) で遠心分離した。

まず、表3の装置およびHPLC条件で、検量線作成、HPLCのシステム適合性確認および共溶出の確認を24時間のインキュベーション終了前に完了した。次に基準対照溶液B、C、陽性対照溶液および試料溶液について、試料溶液の1回目の測定がインキュベーション開始から 24 ± 2 時間となるように測定を開始した。これらの一連のHPLC分析は、30時間未満で終了した。

各溶液の未反応合成ペプチドのピーク面積を

求め、検量線用ペプチド標準液の結果から最小二乗法により検量線を作成した。また、試料溶液および陽性対照溶液の未反応ペプチド減少率は、 $[(1 - \text{試料溶液または陽性対照溶液における未反応ペプチドのピーク面積} / \text{基準対照溶液Cにおけるペプチドのピーク面積の平均値}) \times 100]$ から算出した。

なお、本試験の実施に先立ち、測定日、分析カラムおよび測定者を変動要因とした3回の室内再現性を確認し、未反応ペプチド濃度測定法の妥当性を確認した。

1.2.8 試験成立条件

システイン含有ペプチドの測定を3回実施したが、3回ともに試験成立の許容基準 (表4) をすべて満たした。リジン含有ペプチドの測定についても3回実施したが、1回については陽性対照溶液のペプチド減少率が許容基準を満たさなかったことから、そのデータを不採用とし、4回目の測定を行い、許容基準を満たすことを確認した。

1.3 結果および考察

1) システイン含有ペプチドの試験

習熟度評価用10物質すべてにおいて、シス

表3 装置およびHPLC条件

装置(島津製作所製造)				
ポンプ(2台)	LC-10AD VP			
オートインジェクタ	SIL-10AD VP			
カラムオープン	CTO-10A			
検出器(UV-VIS)	SPD-10A VP			
システムコントローラ	SCL-10A VP			
デガッサ	DGU-14A			
データ処理装置	C-R7A plus			
HPLC条件				
分析カラム	Zorbax SB-C18(内径2.1 mm, 長さ100 mm, 粒子径3.5 μm, アジレント・テクノロジー)			
ガードカラム	Security Guard Cartridge Holder Kit(P/N KJ0-4282, phenomenex) Security Guard Cartridge C18(4.0 mm × 2.0 mm, P/N AJ0-4286, phenomenex)			
カラム設定温度	30℃			
試料設定温度	室温(設定なし)			
測定波長	220 nm			
試料注入量	5 μL			
分析時間	20分間			
移動相	移動相A : 0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸水溶液 移動相B : 0.085%(v/v)トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液			
溶出条件	時間(分)	流速(mL/分)	移動相A(%)	移動相B(%)
	0	0.35	90	10
	10	0.35	75	25
	11	0.35	10	90
	13	0.35	10	90
	13.5	0.35	90	10
	20	終了		
カラムの平衡化	測定前に1時間以上, 移動相A 50%/移動相B 50%, 30℃でカラムを平衡化した。 測定開始前に, 上記の溶出条件で2回繰り返し送液し, カラムの最適化を行った。			

表4 ペプチド結合性試験における試験成立条件および習熟度評価用物質の測定成立条件

		確認項目	許容基準
試験成立条件	検量線の直線性	決定係数(r^2)	0.990より大きい
	HPLCシステムの適合性	基準対照溶液Aのペプチド濃度の平均値	0.50 ± 0.05 mmol/L
	経時的な基準対照溶液の安定性	基準対照溶液Bおよび基準対照溶液Cのペプチドのピーク面積の変動係数(CV)	15.0%未満
	陽性対照溶液のペプチド減少率	平均値	システイン含有ペプチド 60.8~100.0%* リジン含有ペプチド 40.2~69.4%*
		最大標準偏差(SD)	システイン含有ペプチド 14.9%未満 リジン含有ペプチド 11.6%未満
習熟度評価用物質の測定成立条件	試料溶液のペプチド減少率	最大標準偏差(SD)	システイン含有ペプチド 14.9%未満 リジン含有ペプチド 11.6%未満
	習熟度評価用物質の溶解に用いる溶媒の影響	基準対照溶液Cのペプチド濃度の平均値	0.50 ± 0.05 mmol/L

*EURL ECVAM DB-ALM Protocol No. 154 に基づく。

テイン含有ペプチド減少率はガイドラインで規定されている基準範囲内の値を示した(表5)。

なお, オキサゾロンおよびベンジリデンアセトンの2物質については, これら2物質由来のピークと試料溶液由来の未反応ペプチドのピークが完全に重なったことから, 試料溶液から得られた未

反応ペプチドのピーク面積値から共溶出対照溶液で得られたオキサゾロンまたはベンジリデンアセトンのピーク面積値を差し引き, それぞれの試料溶液の未反応ペプチド量を算出した。

ファルネソールは試料溶液調製直後に相分離した。24時間のインキュベーション後には相分

表5 システイン含有ペプチドによる習熟度評価用物質のペプチド結合性試験結果

習熟度評価用物質	沈殿・相分離の有無		遠心の有無 ^{*1}	ペプチドとの共溶出	ペプチド減少率(%)				判定
	添加直後	HPLC分析前			実測値	採用値 ^{*4}	平均値(SD)	基準範囲(平均値)	
2,4-ジニトロクロロベンゼン	無	沈殿	無	無	100	100	100 (0.1%)	90~100	適合
					100	100			
					99.85	99.85			
オキサゾロン	無	沈殿	無	共溶出	71.07 ^{*2}	71.07	71.5 (2.0%)	60~80	適合
					73.61 ^{*2}	73.61			
					69.72 ^{*2}	69.72			
ホルムアルデヒド	無	沈殿	無	無	57.72	57.72	58.3 (4.2%)	30~60	適合
					62.84	62.84			
					54.44	54.44			
ベンジリデンアセトン	無	沈殿	無	共溶出	92.35 ^{*2}	92.35	93.6 (1.1%)	80~100	適合
					94.40 ^{*2}	94.40			
					94.10 ^{*2}	94.10			
ファルネソール	相分離	沈殿	無	無	31.38 ^{*3}	31.38	28.3 (2.9%)	15~55	適合
					25.60 ^{*3}	25.60			
					28.03 ^{*3}	28.03			
2,3-ブタンジオン	無	沈殿	無	無	68.76	68.76	71.9 (2.8%)	60~100	適合
					72.80	72.80			
					74.05	74.05			
1-ブタノール	無	沈殿	無	無	-9.33	0.00	0.0 (0.0%)	0~7	適合
					-0.67	0.00			
					-2.37	0.00			
6-メチルクマリン	無	沈殿	無	無	3.68	3.68	1.2 (2.1%)	0~7	適合
					-8.33	0.00			
					-0.65	0.00			
乳酸	無	沈殿	無	無	2.32	2.32	1.4 (1.2%)	0~7	適合
					-3.72	0.00			
					1.75	1.75			
4-メトキシアセトフェノン	無	沈殿	無	無	-1.57	0.00	5.3 (4.6%)	0~7	適合
					8.15	8.15			
					7.66	7.66			

^{*1} HPLC分析前に発生する少量の白色沈殿は、遠心により沈降しないことが検討でわかっていたため、本試験での遠心は実施しなかった。

^{*2} 試料溶液から得られた未反応ペプチドのピーク面積値から、共溶出対照溶液で得られた習熟度評価用物質由来のピーク面積値を差し引いて算出した。

^{*3} 再試験データ。

^{*4} 負のペプチド減少率は、「0.00」とした。

離は認められなかったが、この試料溶液のシステイン含有ペプチドの減少率の平均値(10.7%)は基準(15~55%)を満たさなかった。この原因として、相分離により、液相中でのファルネソールとペプチドの反応が不十分であったと考えられた。そこで、再実験では試験試料調製直後にアルゴンガスを十分に充填し、最初の実験よりも長い時間穏やかに攪拌して試料溶液とした。その結果、相分離は初回よりも不明瞭で、システイン含有ペプチド減少率の平均値は28.3%となり、基準を満たした。

このように、疎水性の高い化学物質の場合に

は、相分離により、化学物質とペプチドの反応が不完全となり、ペプチド減少率が過小評価され、偽陰性の判定やより低い反応性に分類される可能性がある。今後、相分離が起きた場合には、試料溶液の状態をよく観察し、混和条件に注意する必要がある。

ファルネソールを除く試料溶液では、24時間のインキュベーション後にごく少量の白色沈殿が発生した。この沈殿は、合成ペプチドを含まない共溶出対照溶液では発生しなかったことから、システインが酸化し二量体化したものであると考えられる。未反応合成ペプチドで作成し

表6 リジン含有ペプチドによる習熟度評価用物質のペプチド結合性試験結果

習熟度評価用物質	沈殿・相分離の有無		遠心の有無	ペプチドとの共溶出	ペプチド減少率(%)				判定
	添加直後	HPLC分析前			実測値	採用値*3	平均値(SD)	平均値基準範囲	
2,4-ジニトロクロロベンゼン	相分離	相分離	有	無	13.94	13.94	24.4 (9.1%)	15~45	適合
					29.61	29.61			
					29.64	29.64			
オキサゾロン	沈殿	沈殿	有	共溶出	-*1	-	-	10~55	判定不能
					-*1	-			
					-*1	-			
ホルムアルデヒド	無	無	無	無	11.20	11.20	5.8 (5.6%)	0~24	適合
					-1.42	0.00			
					6.13	6.13			
ベンジリデンアセトン	無	無	無	共溶出	-*1	-	-	0~7	判定不能
					-*1	-			
					-*1	-			
ファルネソール	相分離	無	有	共溶出	4.70*2	4.70	6.3 (3.7%)	0~25	適合
					3.66*2	3.66			
					10.60*2	10.60			
2,3-ブタンジオン	無	無	無	無	27.59	27.59	25.6 (2.2%)	10~45	適合
					23.27	23.27			
					25.97	25.97			
1-ブタノール	無	無	無	無	-1.71	0.00	1.6 (2.1%)	0~5.5	適合
					0.90	0.90			
					3.93	3.93			
6-メチルクマリン	無	無	無	無	0.55	0.55	2.8 (4.4%)	0~5.5	適合
					-0.63	0.00			
					7.91	7.91			
乳酸	無	無	無	無	-2.30	0.00	0.9 (1.5%)	0~5.5	適合
					2.62	2.62			
					-7.53	0.00			
4-メトキシアセトフェノン	無	無	無	無	9.82	9.82	5.5 (3.7%)	0~5.5	適合
					3.45	3.45			
					3.21	3.21			

*1 夾雑物を伴う共溶出のため算出不可。

*2 試料溶液から得られた未反応ペプチドのピーク面積値から、共溶出対照溶液で得られた習熟度評価用物質由来のピーク面積値を差し引いて算出した。

*3 負のペプチド減少率は、「0.00」とした。

た検量線の直線性は良好であり、バラツキも少ないことから、この白色沈殿の発生による結果への影響は低いと考えられた。

2) リジン含有ペプチドの試験

習熟度評価用物質10物質のうち、8物質のリジン含有ペプチド減少率はガイドラインで規定されている基準範囲内の値であった(表6)。

なお、ファルネソールについては、未反応ペプチドのピークとファルネソール由来のピークが完全に重なったことから、試料溶液から得られたペプチドのピーク面積値から共溶出対照溶液で得られたファルネソールのピーク面積値を差し引き、試料溶液の未反応ペプチド量を算出した。

基準を満たさなかったオキサゾロンおよびベンジリデンアセトンの2物質は、約6~11分の範囲にシステイン含有ペプチドでは認められなかった複数の夾雑物のピークが認められる共溶出となり、ペプチド減少率の測定が不能であった。

3) DPRA 予測モデルによる皮膚感作性の予測結果

2種類の合成ペプチドを用いた試験結果から、ガイドラインのDPRA予測モデルに従って10種類の習熟度評価用物質の皮膚感作性を予測した(表7)。その結果、ガイドラインに記載されている予測性と完全に一致し、6物質は陽性、4物質は陰性と判定された。なお、オキサゾロンとベンジリデンアセトンについては、システイ

表7 習熟度評価用物質の反応性の分類と感作性の予測結果

習熟度評価用物質	ペプチド減少率の平均値(%)		2種類の ペプチド減少率の 平均値(%)	反応性の分類*1	感作性の予測結果
	システイン含有 ペプチド	リジン含有 ペプチド			
2,4-ジニトロクロロベンゼン	100	24.4	62.2	High reactivity	陽性
オキサゾロン	71.5	-	-	Moderate reactivity	陽性
ホルムアルデヒド	58.3	5.8	32.1	Moderate reactivity	陽性
ベンジリデンアセトン	93.6	-	-	Moderate reactivity	陽性
ファルネソール	28.3	6.3	17.3	Low reactivity	陽性
2,3-ブタンジオン	71.9	25.6	48.8	High reactivity	陽性
1-ブタノール	0	1.6	0.8	No or minimal reactivity	陰性
6-メチルクマリン	1.2	2.8	2	No or minimal reactivity	陰性
乳酸	1.4	0.9	1.2	No or minimal reactivity	陰性
4-メトキシアセトフェノン	5.3	5.5	5.4	No or minimal reactivity	陰性

*1 OECD TG 442C, Table 1: Cysteine 1:10/lysine 1:50 prediction model による分類。ただし、オキサゾロンおよびベンジリデンアセトンは、Table 2: Cysteine 1:10 prediction model を用いた。

ン含有ペプチドの結果のみで予測した。

習熟度評価用の10物質のうち、ファルネソール、オキサゾロンおよびベンジリデンアセトンについては、共溶出対照溶液のピークと試料溶液の未反応ペプチドのピークが完全に重なったことから、共溶出対照溶液の値を差し引くことによってペプチド減少率を求めた。ガイドラインでは、このような共溶出はHPLCの設定条件をわずかに調整することで解決できる可能性がある」と記載されている。今後更に、ピーク分離が可能なHPLC条件を検討したい。

今回我々はDPRAを実施し、習熟度評価用物質10物質のうち少なくとも8物質がガイドラインに記載された基準を満たし、DPRA予測モデルによるこれら10物質の皮膚感作性の予測結果は、ガイドラインに記載されているDPRA予測結果と完全に一致することを確認した。これらの結果から、ガイドラインで要求されている試験施設でのペプチド結合性試験(DPRA)の技術的習熟度に問題はないことが示された。

2. ARE-Nrf2 Luciferase Test Method

本試験は、OECD TG 442DおよびEURL ECVAM DB-ALM, Protocol n° 155: KeratinoSens^{TM9)}に準拠して実施した。

2.1 試験の原理

ARE-Nrf2 Luciferase Test Methodは、感作性物質によって発現誘導されることが知られている遺伝子のARE(Antioxidant response element)制御下でルシフェラーゼ遺伝子が発

現するベクターを導入した細胞を用いるレポーターアッセイ系で、UN GHSに従った皮膚感作性物質と非感作性物質の識別に利用するための*in vitro*試験法である。このガイドラインで使用するKeratinoSensTM細胞は、ヒトケラチノサイト由来のHaCaT細胞にヒトAKR1C2遺伝子のARE制御下のルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞で、この細胞におけるルシフェラーゼの発現は、感作性物質による転写因子Nrf2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2)遺伝子の活性化を反映し、かつNrf2依存的事であることが実証されている。したがって、この細胞を被験物質で処理し、ルシフェラーゼ遺伝子の発現誘導をその発光量で調べることにより、被験物質の皮膚感作性を予測することが可能となる。

2.2 材料および方法

2.2.1 使用細胞

KeratinoSensTM(入手日:2016年6月17日、継代数:6)は、Givaudan Schweiz AG(Dubendorf, Switzerland)より購入した。牛胎児血清(FBS, 非働化済み、終濃度:9.1%)および抗生物質(Geneticin:G418, 終濃度:500 µg/mL)を含むダルベッコ改変イーグル培地(以下、DMEM培地)を用いて37℃、5% CO₂の条件下で培養した。試験用に凍結保存した細胞を解凍後は2~4日ごとに継代し、25代以内の継代数で使用した。

2.2.2 習熟度評価用物質および陽性対照物質

OECD TG 442D ANNEX 3に記載されてい

表8 OECD TG 442D ANNEX 2に記載されているARE-Nrf2 luciferase test methodの習熟度評価用物質

習熟度評価用物質	CAS No.	メーカー	<i>In vivo</i> による予測*	KeratinoSens™による予測*
1 イソプロパノール	67-63-0	和光純薬工業 (大阪)	非感作物質	陰性
2 サリチル酸	69-72-7	和光純薬工業 (大阪)	非感作物質	陰性
3 乳酸	50-21-5	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)	非感作物質	陰性
4 グリセロール	56-81-5	和光純薬工業 (大阪)	非感作物質	陰性
5 シンナミルアルコール	104-54-1	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)	感作物質 (弱い [weak])	陽性
6 ジメタクリル酸エチレングリコール	97-90-5	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)	感作物質 (弱い [weak])	陽性
7 2-メルカプトベンゾチアゾール	149-30-4	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)	感作物質 (中程度 [moderate])	陽性
8 メチルジプロモ グルタロニトリル	35691-65-7	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)	感作物質 (強い [strong])	陽性
9 4-(メチルアミノ)フェノール硫酸塩	55-55-0	和光純薬工業 (大阪)	感作物質 (強い [strong])	陽性
10 2,4-ジニトロクロロベンゼン	97-00-7	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)	感作物質 (非常に強い [extreme])	陽性

* OECD TG 442D ANNEX 2を参照した。

る10物質を用いた(表8)。それらは、*in vivo*における予測(LLNA結果)において非感作物質とされる4物質および感作物質とされる6物質である。

陽性対照物質として *trans*- シンナムアルデヒド [CAS番号14371-10-9, 分子量132.16, 純度99.1% (GC), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), 以下, シンナムアルデヒド]を用いた。

2.2.3 試験液の調製

習熟度評価用物質はすべて第一選択溶媒であるジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解したことから、それらをDMSOに溶解して200 mmol/Lの原液を調製した。原液を溶媒で希釈して12濃度(0.098~200 mmol/L, 公比2)の習熟度評価用物質試験液を調製した。

陽性対照物質については、DMSOに溶解して調製した200 mmol/Lの溶液を、さらにDMSOで希釈して6.4 mmol/Lの陽性対照物質原液を調製した。それを公比2で希釈して5濃度(0.4~6.4 mmol/L)の陽性対照物質試験液を調製した。

陰性対照物質としてDMSOをそのまま使用した。習熟度評価用物質試験液、陽性対照物質試験

液および陰性対照物質をさらに1% FBS含有DMEM培地で25倍希釈してそれぞれの処理用培地を調製し、処理に用いた。

2.2.4 細胞播種および処理

試験には96ウェルプレートを用い、1プレート内に、陰性対照物質は6ウェル、習熟度評価用物質(最大7物質同時実施可能)および陽性対照物質については各濃度1ウェルを配置し、ルシフェラーゼ活性測定用として3枚の白色96ウェルプレートを、細胞生存率測定用として1枚の透明96ウェルプレートを用いた。

KeratinoSens™細胞を各プレートに播種(1×10⁴細胞/ウェル)した。24時間培養後、96ウェルプレートの培地を1% FBS含有DMEM培地150 μLと交換した。さらに、習熟度評価用物質処理用培地、陽性対照物質処理用培地および陰性対照物質処理用培地を合計4枚の96ウェルプレートに50 μL/ウェルずつ添加した。プレートシールを貼り、37℃、5% CO₂インキュベーター内で48時間培養した。

培養終了後、ルシフェラーゼ活性測定用のプレートについては、測定が重ならないように、3枚の白色プレートの開始時間をずらして以下

の操作を行った。

各ウェルの培地を除き、リン酸緩衝液で洗浄、細胞溶解緩衝液(Promega, Madison, WI)を20 μ L/ウェル添加して室温で20分静置した。各ウェルにルシフェラーゼ基質(Promega, Madison, WI)を50 μ L分注後、1秒静置し、2秒間の発光量積算となるよう設定したルミノメーター(フェリオス, AB-2350, アトー)で発光量を測定した。

細胞生存率測定用のプレートについては、培地を除き、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(MTT)を595 μ g/mLの濃度となるように1% FBS含有DMEM培地に溶解したMTT培地を添加後、37°C, 5% CO₂インキュベーター内で4時間培養した。培養終了後MTT培地を除き、10%ドデシル硫酸ナトリウム溶液をウェルあたり200 μ L添加し、37°C, 5% CO₂インキュベーター内で一晩以上静置し細胞を溶解した。測定前にプレートを10分間攪拌し、595 nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(モデル 680 マイクロプレートリーダー, BIO RAD)で測定した。

以上の実験を1回(rep1)とし、別の日に2回(rep2)ないし3回(rep3)の実験を実施し、それらの結果を1試験の結果として判定に用いた。

2.2.5 誘導倍率およびEC_{1.5}の算出

実験毎に、各濃度におけるルシフェラーゼ活性の誘導倍率(習熟度評価用物質または陽性対照物質の発光値/陰性対照物質の発光値の平均値)を算出した。さらに、各物質の最大誘導倍率(I_{max})を各実験の最大誘導倍率の平均値から算出した。

次に、ガイドラインに記載されている計算式を用いてルシフェラーゼ活性の誘導倍率が1.5倍となる濃度(EC_{1.5})を実験毎に算出し、その値から求めた幾何平均値(GeoMean)をその物質のEC_{1.5}とした。

2.2.6 細胞生存率の算出

MTT法による吸光度の結果から、陰性対照物質に対する処理物質の細胞生存率が50%減および30%減となる濃度(IC₅₀およびIC₃₀)を実験毎に算出した。各実験から算出したIC₅₀およびIC₃₀の幾何平均値をその物質のIC₅₀お

よびIC₃₀とした。

2.2.7 試験成立条件

次に示す①~③の条件を満たした場合、試験成立とした。

- ① 各実験の陽性対照物質のルシフェラーゼ活性の誘導倍率が少なくとも1濃度で1.5倍超となり、統計学的に有意であること。
- ② 各実験の陽性対照物質のEC_{1.5}値が背景値の2倍の標準偏差内であること(本試験ではバリデーション済みのデータセットに基づいた値として7~30 μ mol/Lを用いた)。さらに、陽性対照物質64 μ mol/Lの濃度における誘導倍率の平均値が2~8の間であること。
- ③ 各実験の陰性対照(DMSO)における発光値(6ウェル/プレート×3プレート、合計18ウェル)の変動係数が20%未満であること。

2.2.8 判定

最低2回の実験において、次に示す①~④の条件をすべて満たした場合を陽性とし、それ以外の場合は陰性とした。

- ① I_{max}が1.5倍超であり、陰性対照に対し統計学的に有意であること。
- ② EC_{1.5}の判定濃度において、細胞生存率が70%を超えていること。
- ③ EC_{1.5}が1000 μ mol/L未満であること。
- ④ ルシフェラーゼの誘導に濃度依存的な反応が認められること。

2.3 結果および考察

習熟度評価用10物質のARE-Nrf2 Luciferase Testを実施するために8回の実験を行ったが、そのすべての実験が試験成立条件を満たしていることを確認した(表9)。

習熟度評価用物質の試験結果を表10および表11に示した。

KeratinoSens™における予測が陰性である4物質については、すべて陰性であり、EC_{1.5}およびIC₅₀についてもすべて基準範囲内の値を示した。

KeratinoSens™における予測が陽性である6物質は、すべて陽性であった。そのうち4物質については、EC_{1.5}およびIC₅₀の基準を満た

表9 ARE-Nrf2 luciferase test における試験成立条件とその判定結果

試験回数	実験回数	陽性対照物質					EC _{1.5} ($\mu\text{mol/L}$)	陰性対照の 変動係数* ¹ (%)	判定* ²
		各濃度($\mu\text{mol/L}$)における誘導倍率							
		4	8	16	32	64			
Run 1	rep 1	1.16	1.31	1.72*	2.23*	5.30*	11.7	6.2	成立
	rep 2	1.10	1.20	1.56*	1.74*	2.80*	14.8	11.7	成立
Run 2	rep 1	1.28	1.37	1.87*	2.52*	7.21*	10.1	9.9	成立
	rep 2	1.11	1.10	1.47	1.79*	5.41*	17.4	8.3	成立
Run 3	rep 1	0.97	1.16	1.42	2.30*	6.25*	17.5	11.2	成立
	rep 2	1.12	1.15	1.52*	2.15*	3.74*	15.5	7.7	成立
Run 4	rep 1	1.38	1.36	1.64*	2.21*	5.76*	12.0	11.3	成立
	rep 2	1.27	1.24	1.57*	2.01*	3.99*	14.4	11.3	成立

*¹ 陰性対照(DMSO)の発光値(合計18ウェル)から変動係数を算出した。

*² 次の判定基準①~③の条件をすべて満たした場合「成立」とした。

①陽性対照物質のEC_{1.5}が7~30 $\mu\text{mol/L}$ の間であること。

②陽性対照物質64 $\mu\text{mol/L}$ の濃度において、その誘導倍率の平均値が2~8の間であること。

③陰性対照(DMSO)の発光値の変動係数が20%未満であること。

* : 誘導倍率が1.5倍を超え、t検定で有意であった(p<0.05)。

表10 習熟度評価用物質のARE-Nrf2 luciferase testの結果(最大誘導倍率およびEC_{1.5})

習熟度評価用物質	最大誘導倍率(I _{max})			EC _{1.5} ($\mu\text{mol/L}$)				総合判定
	rep 1	rep 2	Average	rep 1	rep 2	GeoMean	基準範囲* ¹	
1 イソプロパノール	1.01	1.16	1.09	> 2000	> 2000	> 2000	> 1000	陰性
2 サリチル酸	1.16	1.13	1.15	> 2000	> 2000	> 2000	> 1000	陰性
3 乳酸	1.04	1.11	1.07	> 2000	> 2000	> 2000	> 1000	陰性
4 グリセロール	1.25	1.09	1.17	> 2000	> 2000	> 2000	> 1000	陰性
5 シンナミルアルコール	5.54*	2.48*	4.01	176.8	210.9	193.1	25 - 175	陽性
6 ジメタクリル酸エチレングリコール	31.03*	42.47*	36.75	63.7	61.9	62.8	5 - 125	陽性
7 2-メルカプトベンゾチアゾール	5.57*	7.41*	6.49	73.1	101.3	86.1	25 - 250	陽性
8 メチルジプロモ グルタロニトリル	2.67*	2.66*	2.67	11.7	10.5	11.1	< 20	陽性
9 4-(メチルアミノ)フェノール硫酸塩	6.81*	7.09*	6.95	1.3	0.7* ²	1.0	< 12.5	陽性
10 2,4-ジニトロクロロベンゼン	7.80*	11.83*	9.82	3.7	3.9	3.8	< 12.5	陽性

*¹ OECD TG 442D ANNEX 2を参照した。

*² 最低濃度(0.98 $\mu\text{mol/L}$)において誘導倍率が1.5を超えたことから、用量反応曲線より算出した。

* : I_{max}が1.5倍を超え、t検定で有意であった(p<0.05)。

表11 習熟度評価用物質のARE-Nrf2 luciferase testの結果(IC₅₀およびIC₃₀)

習熟度評価用物質	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)				IC ₃₀ ($\mu\text{mol/L}$)		
	rep 1	rep 2	GeoMean	基準範囲* ¹	rep 1	rep 2	GeoMean
1 イソプロパノール	> 2000	> 2000	> 2000	> 1000	> 2000	> 2000	> 2000
2 サリチル酸	> 2000	> 2000	> 2000	> 1000	> 2000	> 2000	> 2000
3 乳酸	> 2000	> 2000	> 2000	> 1000	> 2000	> 2000	> 2000
4 グリセロール	> 2000	> 2000	> 2000	> 1000	> 2000	> 2000	> 2000
5 シンナミルアルコール	> 2000	> 2000	> 2000	> 1000	1706	> 2000	> 1706
6 ジメタクリル酸エチレングリコール	697.4	974.3	824.3	> 500	524.4	875.0	677.4
7 2-メルカプトベンゾチアゾール	> 2000	> 2000	> 2000	> 500	1504	1819	165
8 メチルジプロモ グルタロニトリル	30.5	38.3	34.2	20 - 100	26.0	29.3	27.6
9 4-(メチルアミノ)フェノール硫酸塩	12.9	13.5	13.2	20 - 200	11.5	11.5	11.5
10 2,4-ジニトロクロロベンゼン	11.0	13.4	12.1	5 - 20	9.1	12.3	10.6

*¹ OECD TG 442D ANNEX 2を参照した。

したが、シンナミルアルコールのEC_{1.5}は基準範囲上限である175 µmol/Lを超え(176.8, 210.9 µmol/L), 4-(メチルアミノ)フェノール硫酸塩のIC₅₀は基準範囲下限である20 µmol/Lを下回った(12.9, 13.5 µmol/L).

シンナミルアルコールについては購入元を, 4-(メチルアミノ)フェノール硫酸塩については溶媒を変えて試験を実施したが, それらの結果に大きな差は見られず, 基準を満たすことはできなかった.

本法のバリデーション試験では, 5施設でそれぞれ3回試験を実施した結果が報告されている^{10,11)}. シンナミルアルコールの場合, 個々の実験のEC_{1.5}は59.5~190.9 µmol/Lの範囲であり, 少なくとも今回の1実験の値はバリデーション試験の範囲内であった. また, 4-(メチルアミノ)フェノール硫酸塩の個々の実験のIC₅₀は9.8~172.1 µmol/Lの範囲であり, 我々の実験で得られたIC₅₀(12.9~19.5 µmol/L)はバリデーション試験で得られた範囲内であった.

以上のように, シンナミルアルコールのEC_{1.5}の1データのみがバリデーション試験の報告データをわずかに超える値となったが, 基準の範囲外となったそれ以外のデータはバリデーション試験の範囲内のデータであり, 許容可能であると考えられる.

今回我々はARE-Nrf2 Luciferase Testを実施し, 習熟度評価用物質10物質のうち少なくとも8物質がガイドラインに記載された基準を満たし, 10物質の皮膚感作性の予測結果は, ガイドラインに記載されているARE-Nrf2 Luciferase Testの予測結果と完全に一致することを確認した. これらの結果から, ガイドラインで要求されている試験施設でのARE-Nrf2 Luciferase Testの技術的習熟度に問題はないことが示された.

結論

*In chemico/in vitro*皮膚感作性試験の試験法ガイドラインであるOECD TG 442CおよびOECD TG 442Dではともに, 試験施設がこの試験を開始する前にこれらの試験法に関する技術的な習熟度を示すために, 習熟度評価用の10物質の試験を実施し, 10物質の感作性を正しく予測すると

ともに, 少なくとも8物質がそれぞれのガイドラインに記載されている基準を満たす必要があるとされている. 今回我々は, ガイドラインに従ってDPRAおよびARE-Nrf2 Luciferase Testのそれぞれの習熟度評価用10物質の試験を実施した結果, 両試験ともに10物質の感作性を正しく予測し, 8物質についてガイドラインの基準を満たすことを示した. これらの結果から, 秦野研究所がOECDガイドラインに従ったDPRAおよびARE-Nrf2 Luciferase Testの試験施設として, 技術的習熟度に問題のないことを示すことができた.

文献

- 1) OECD: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins; Part 1: Scientific Evidence, 2012,
- 2) OECD: OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C, *In Chemico* Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA), 2015, http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation_9789264229709-en
- 3) OECD: OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442D, *In Vitro* Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method, 2015, http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442d-in-vitro-skin-sensitisation_9789264229822-en
- 4) OECD: OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E, *In Vitro* Skin Sensitisation: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 2016, http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-in-vitro-skin-sensitisation_9789264264359-en
- 5) OECD: OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 429, Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, 2010,
- 6) OECD: OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442A, Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay: DA, 2010,
- 7) OECD: OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442B, Skin Sensitisation: Local

- Lymph Node Assay: BrdU-ELISA, 2010, http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442b-skin-sensitization_9789264090996-en
- 8) EURL ECVAM: EURL ECVAM Database service on Alternative Methods to animal experimentation (EURL ECVAM DB-ALM), Protocol n° 154: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for Skin Sensitisation Testing. [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/protocols/protocol/direct-peptide-reactivity-assay-\(dpra\)-for-skin-sensitisation-testing/key/p_1542](https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/protocols/protocol/direct-peptide-reactivity-assay-(dpra)-for-skin-sensitisation-testing/key/p_1542)
- 9) EURL ECVAM: EURL ECVAM Database service on Alternative Methods to animal experimentation (EURL ECVAM DB-ALM), Protocol n° 155: KeratinoSensTM,
- 10) EURL ECVAM: EURL ECVAM Recommendation on the KeratinoSensTM assay for skin sensitisation testing, 2. Relevant validation study reports, Attachments: *INVITTOX* Protocol KeratinoSens.
- 11) Natsch A, Bauch C, Foertsch L, Gerberick F, Normann K, Hilberer A, Inglis H, Landsiedel R, Onken S, Reuter H, Schepky A, Emter R: 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* 2011, 25, 733-744.