



第4項
健康への影響

試験ガイドライン No.442E
In vitro 皮膚感作性

皮膚感作性の有害性発現経路 (AOP) での
キーイベントである樹状細胞活性化を
用いた *in vitro* 皮膚感作性試験

2024年6月25日

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



採択：

2022年6月30日

修正：2024年6月25日

OECD の化学物質の試験に関するガイドライン

有害性発現経路（AOP）でのキーイベントである樹状細胞活性化を用いた *in vitro* 皮膚感作性試験

はじめに

キーイベントである樹状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、国際連合の「化学物質の分類および表示に関する世界調和システム」(UN GHS)により定義されている通り、皮膚接触後にアレルギー反応を惹起する物質のことをいう(1)。皮膚感作性の原因となる主要な生物学的イベントに関しては、広く意見が一致している。皮膚感作性に伴う化学的、生物学的機序に関する現在の知識は、有害性発現経路(Adverse Outcome Pathway: AOP)(2)の形式で要約され、分子レベルのイニシャルイベントから中間イベントを経て、具体的にはアレルギー性接触皮膚炎である有害作用に至るまでを含む。この場合、分子レベルのイニシャルイベント(1つ目のキーイベント)は、皮膚蛋白質の求核中心と求電子性物質との共有結合のことである。本AOPにおける2つ目のキーイベントは角化細胞に起こり、炎症性反応や特異的細胞シグナル伝達経路による遺伝子発現の変化からなる。このようなものに、抗酸化剤／求電子物質応答配列(antioxidant/electrophile response element: ARE)依存性経路がある。3つ目のキーイベントは樹状細胞(DC)活性化であり、通常は特異的な細胞表面マーカー、ゲノム転写産物、ケモカインおよびサイトカインの発現により評価される。4つ目のキーイベントは、T細胞活性化と増殖であり、マウス局所リンパ節試験(LLNA)で間接的に測定しうる(3)。
2. この試験ガイドライン(TG)では、皮膚感作性に対するAOPの樹状細胞活性化に関するキーイベントの基礎にある機序を扱う *in vitro* 試験について記載する(2)。このTGは、UN GHSに基づく皮膚感作性物質と非感作性物質とを識別するのに用いられる試験方法に関する(1)。

本TGに記載されている試験方法は次の通り：

- ヒト細胞株活性化試験(h-CLAT)
- U937 細胞株活性化試験(U-SENS™)
- インターロイキン-8 レポーター遺伝子アッセイ(IL-8 Luc アッセイ)
- 皮膚感作性物質の評価(GARD™skin)に関するゲノムアレルゲン迅速検出(GARD™)

キーイベントに基づく試験のガイドラインの試験方法の背景と概要

3. 皮膚感作性の評価には、通常、実験動物が使用されてきた。モルモットを用いる古典的方法である Magnusson and Kligman のモルモットマキシマイゼーション法 (GPMT) およびビューラー法 (TG 406) (4) は、皮膚感作性の誘導相および誘発相の両者を評価する。マウスを用いる試験である LLNA (TG 429) (3) と、その非放射性修正法 2 種類、具体的には LLNA : DA (TG 442 A) (5) および LLNA : BrdU-ELISA (TG 442 B) (6) はいずれも、誘導相のみを評価するものであり、皮膚感作性の誘導相を客観的に測定するとともに動物福祉という点でモルモット試験より優れていることから受け入れられている。

4. 皮膚感作性 AOP の 1 つ目のキーイベント (OECD TG 442C (7)) および 2 つ目のキーイベント (OECD TG 442D (8)) を対象とした *in chemico* および *in vitro* の機序に基づく試験法が、化学物質の皮膚感作性の有害性を評価するのに役立つことが認められている。

5. 皮膚感作性物質は、DC 活性化と結びついた CD40、CD54、CD80、CD83 および CD86 などの細胞膜マーカーの発現や、IL-1 β および TNF- α などの炎症誘発性サイトカイン、IL-8 (CXCL8) および CCL3 (9) (10) (11) (12) など数種のケモカインを誘導することが報告されている (2)。本 TG に記載した試験方法は、感作性物質に曝露したあとの単球および DC の活性化プロセスによる細胞表面マーカー (CD54、CD86)、サイトカインである IL-8 または一連の遺伝子 (ゲノムバイオマーカーシグネチャ) の発現の変化のいずれかを定量する。

6. ただし、DC 活性化は皮膚感作 AOP のひとつのキーイベントのみを示すため (2) (13)、DC 活性化のマーカーを測定する単独の試験法で得た情報のみを用いて、化学物質の皮膚感作性の有無を結論づけるには十分ではない。従って、本試験ガイドラインに記載された試験法により得られたデータは、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、ならびに *in silico* モデル化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た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のを支援するために提示されるものである (13)。一連の情報源とこれを用いて行われるデータ解釈作業に関する標準化された方法である確定方式 (Defined Approach) で得たデータの使用例が発表されており (13)、OECD TG における皮膚感作性の確定方式に導入されている (14)。これらの方法から得られたデータを皮膚感作性の確定方式で使用することを意図している場合、ボーダーライン基準の適用やその他のデータの解釈手順については、試験ガイドライン 497 を参照すること。ボーダーライン基準の適用に関する詳細は付属書 1 の図 1 を参照のこと。

7. 本試験ガイドラインに含まれる試験法は、手順、適用範囲及び限界に関して異なる可能性があるが、皮膚感作性での AOP の樹状細胞活性化に対するキーイベントの試験結果に関して、各国の要求事項に対応するために、それぞれ使用することができ、OECD でのデータの相互受け入れにも役立つ。確定方式(DAs)では、方法は自動的に互換性があるわけではない; TG497 ではどの試験法/試験方法の組み合わせを用いるべきかが規定されている。

8. 本試験ガイドラインに記載した試験方法を単独で用いて、皮膚感作性物質を当局が UN GHS で定義した細区分である 1A および 1B に分類することはできず (1)、安全性評価に際し、皮膚感作性の強さを予測することもできない。ただし、特定の規制の枠組みによっては、上記方法で得た陽性結果を単独で用いて、化学物質を UN GHS 区分 1 に分類できる場合がある。

9. 「被験化学物質」という用語は、本試験法ガイドラインで用いる場合、試験の対象となる物質のことをいい¹、被験化学物質が单一成分物質、多成分物質、および／または混合物であるかは本試験法

への適用を規定するものではない。多成分物質／混合物の試験に本試験法を適用することに関しては、現時点では情報が限られている (15) (16)。本試験法は、多成分物質および混合物の試験に技術的には適用可能である。混合物、試験困難化学物質（不安定など）、本ガイドラインに記載されている適用範囲に収まることが明確でない被験化学物質の試験を検討する場合、そのような試験で科学的に意味のある結果が生じるかどうかを事前に考慮する必要がある。さらに、多成分物質または混合物の試験の場合、認められる反応に細胞毒性成分が影響しうることを考慮する。

参考文献

1. United Nations UN (2015), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: [\[https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html\]](https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html).
2. OECD (2012), The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
3. OECD (2010), The Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 429, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
4. OECD (1992), Skin Sensitisation. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 406, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
5. OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay: DA. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442A, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
6. OECD (2010), Skin sensitisation: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442B, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
7. OECD (2015), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
8. OECD (2015), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
9. Steinman RM. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-96.
10. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. 1994. B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841-7.
11. Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. 1997. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031-8.
12. Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami H. 2003. p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390-8.

13. 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 Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. [ENV/JM/MONO\(2016\)29](https://community.oecd.org/community/iatass). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [https://community.oecd.org/community/iatass].
14. OECD. (2022). Guideline No. 497: Guideline on Defined Approaches for Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
15. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010), A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.
16. Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinuzzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. Toxicol. In Vitro 29, 901-916.

付属書 1 : In vitro 皮膚感作性 : ヒト細胞株活性化試験 (h-CLAT)

最初に考慮すべき事項および限界

1. h-CLAT 法は、ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 の単球および樹状細胞（DC）が活性化されて生じる細胞表面マーカー（CD86 および CD54）の発現の変化を定量する(1)(2)。測定された CD86 および CD54 の細胞表面マーカーの発現量を用いて、皮膚感作性物質と非感作性物質との識別を支援する。
2. h-CLAT 法は、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）主導のバリデーション試験とそれに続く EURL ECVAM の科学諮問委員会（Scientific Advisory Committee ; ESAC）による独立したピアレビュー（第三者評価）で評価されている。入手可能な証拠と規制当局およびステークホルダーからの情報をすべて考慮し、h-CLAT は、有害性の分類および表示を目的に、感作性物質と非感作性物質とを識別するために IATA の一環として用いることが EURL ECVAM によって推奨されている(3)。h-CLAT データの使用と他の情報との併用に関する例が、文献で報告されている(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)。
3. h-CLAT は、細胞培養技術とフローサイトメトリー分析の経験がある施設への技術移管が可能であることが確認されている。本試験法に見込まれる予測結果の再現性は、同一施設内および複数の施設間でいずれも約 80% である(3)(12)。バリデーション試験(13)および発表された他の研究(14)から得られた結果によると、LLNA の結果と比較した場合、皮膚感作性物質（UN GHS 区分 1）と非感作性物質とを識別する正確度は 85% (N = 142)、感度は 93% (94/101)、特異度は 66% (27/41) であった（段落 4 の記載の通り、Log Kow が 3.5 を超える化学物質の陰性結果を含まないすべての既存データでの EURL ECVAM(12)による再解析に基づく）。h-CLAT での偽陰性結果の予測は、皮膚感作性が高い化学物質（UN GHS 細区分 1A）よりも、皮膚感作性が低い中程度の化学物質（UN GHS 細区分 1B）に認められる可能性が高い(4)(13)(15)。総合すると、上記情報は、h-CLAT が皮膚感作性の有害性を識別するのに有用であることを示している。ただし、h-CLAT 法は、IATA に基づく他の情報を併用し、「はじめに」の段落 6 および段落 8 の条項に従って検討されるべきであることから、h-CLAT を単独の試験法として算出した正確度の値は指標にすぎない。さらに、動物を用いない皮膚感作性試験法を評価する場合、LLNA 試験もその他の動物試験も、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ると、h-CLAT は、有機官能基、反応メカニズム、皮膚感作性の強度（*in vivo* 試験で判定される）、物理化学的特性がさまざまな被験化学物質に適用可能であることが示されている(3)(14)(15)。h-CLAT は、適切な溶媒／媒体（段落 14 参照）に可溶であるか安定した分散液（被験化学物質が沈殿することも、溶媒／媒体から分離して異相を示すこともないコロイドまたは懸濁液）となる被験化学物質に適用可能である。Log Kow が 3.5 を超える被験化学物質は、偽陰性結果をもたらす傾向がある(14)。そのため、Log Kow が 3.5 を超える被験化学物質で得られた陰性結果を判断に用いてはならない。ただし、Log Kow が 3.5 を超える被験化学物質で得られた陽性結果については、被

驗化学物質が皮膚感作性物質であるとの判断を裏付けている。さらに、h-CLAT に用いられる細胞株の代謝能が限定的 (16) であることや実験条件から、プロハプテン（酵素 P450 を介するなど酵素による活性化を要する物質）および特に酸化速度が遅いプレハプテン（酸化により活性化される物質）も、h-CLAT 陰性結果を示す場合がある (15)。蛍光被驗化学物質は h-CLAT で評価できるが (17)、フルオレセイン・イソチオシアネート (FITC) またはヨウ化プロピジウム (PI) と同じ波長の強い蛍光被驗化学物質は、フローサイトメトリーによる検出を干渉するため、FITC 標識抗体または PI を用いて正確に評価できない。このような場合、補遺 II 収載の習熟度確認物質による FITC 標識抗体 (段落 24 参照) または PI (段落 18 参照) と同様の結果をもたらすことが示される場合に限り、他の蛍光色素で標識された抗体、または他の細胞毒性マーカーを用いることができる。上記を踏まえて、陰性結果は、示されている限界や、IATA の枠組み内の他の情報源に照らして解釈する必要がある。他の特定のカテゴリーに属す被驗化学物質に h-CLAT を適用できない証拠がある場合、h-CLAT をそのようなカテゴリーに属す物質に用いるべきではない。

5. 上記の通り、h-CLAT は、皮膚感作性物質と非感作性物質との識別を支援することができる。一方、IATA などの統合的アプローチの中で用いられた場合、感作性の強度の評価が可能な場合もある (4) (5) (9)。

6. 用語の定義を補遺 I に示す。

試験の概要

7. h-CLAT は、被驗化学物質曝露 24 時間後に、ヒト単球性白血病細胞株の THP-1 細胞の細胞表面マーカー発現 (CD86 および CD54) の変化を定量する *in vitro* 試験である。ここに挙げた表面分子は、単球系細胞 THP-1 活性化の典型的マーカーで、T 細胞プライミングに重要な役割を担う DC 活性化を再現すると考えられる。蛍光色素で標識された抗体で細胞を染色したあと、表面マーカー発現の変化をフローサイトメトリーで測定する。表面マーカー発現のアップレギュレーションが、細胞毒性に達しない濃度で生じるか評価するため、同時に細胞毒性も測定する。溶媒／媒体対照との比較で表面マーカーの相対蛍光強度を算出し、感作性物質と非感作性物質との識別を支援するための予測モデル (段落 26 参照) に使用する。

習熟度の立証

8. 試験法ガイドライン 442E の付属書に記載されている試験法を日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、補遺 II 収載の習熟度確認用の 10 物質を用いて技術的習熟度を立証する。さらに、本試験法使用者は、反応性のチェック (段落 11 参照) と、陽性対照および溶媒／媒体対照 (段落 20~22 参照) により得られたデータの背景データベースを保管し、このようなデータを用いて、実施施設での本試験法の再現性が経時に維持されていることを確認する。

手順

9. 本試験法は、EURL ECVAM 主導で行われたバリデーション試験に用いたプロトコルである h-CLAT に関する動物実験代替法データベースサービス (DB-ALM) プロトコル番号 158 (18) に基づいている。実施施設で h-CLAT を導入し使用する場合、本プロトコルを用いることが推奨される。用量設定試験および CD86/CD54 発現測定の 2 段階からなる h-CLAT の主要な構成要素および手順について以下

に記す。

細胞の調製

10. h-CLAT の実施には、ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 を使用する。使用する細胞 (TIB-202TM) は、American Type Culture Collection のような十分な適正資格をもつ細胞バンクから入手することが推奨される。

11. THP-1 細胞は室温 37°C、5% CO₂ の加湿雰囲気下で、10% ウシ胎児血清 (FBS)、0.05 mM 2-メルカプトエタノール、100 単位/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した RPMI-1640 培地で培養する。培養液にペニシリンとストレプトマイシンを使用しない場合もある。ただし、使用しない場合、本試験法の利用者は、例えば、補遺 II の習熟度確認物質の試験により、培養液に抗生物質が含まれていないことが結果に影響を与えないことを検証しなければならない。いずれの場合においても、汚染のリスクを最小限にするために、細胞培養液に抗生物質が存在するか否かに関係なく、優れた細胞培養法を実施すべきである。THP-1 細胞は、2~3 日に一回、定期的に密度 0.1~0.2 × 10⁶ cells/mL で播種する。密度 0.1~1.0 × 10⁶ cells/mL を維持する。細胞を試験に使用する前に、反応性のチェックを行い、適正であることを判断する。細胞の反応性チェックは、陽性対照である 2,4-ジニトロクロロベンゼン (DNCB) (CAS 番号 : 97-00-7、純度 99%以上) および硫酸ニッケル (NiSO₄) (CAS 番号 : 10101-97-0、純度 99%以上) と、陰性対照である乳酸 (LA) (CAS 番号 : 50-21-5、純度 85%以上) を用いて、解凍 2 週間後に実施する。DNCB および NiSO₄ が、CD86 および CD54 の細胞表面マーカーに関して陽性反応を示し、LA が CD86 および CD54 の細胞表面マーカーに関して陰性反応を示さなければならない。反応性チェックで適正と判断された細胞のみを試験で使用する。細胞は、解凍後、最長 2 カ月にわたって増殖させることが可能である。継代数は 30 回を超えてはならない。反応性チェックは、段落 20~24 に記載の手順に従って実施する。

12. 試験では、0.1 × 10⁶ cells/mL または 0.2 × 10⁶ cells/mL の密度で THP-1 細胞を播種し、それぞれ 72 時間または 48 時間、培養フラスコで前培養する。前培養期間直後の培養フラスコの細胞密度を、(上記の前培養 2 条件のうち、どちらかを用いて) 各実験で可能な限り同じにすることが重要である。その理由は、前培養期間直後の培養フラスコの細胞密度が、アレルゲン誘発性 CD86/CD54 発現に影響を及ぼす可能性があるためである (19)。試験当日、培養フラスコから採取した細胞を、2 × 10⁶ cells/mL で新たな培養液に再懸濁する。次に、24 ウェル平底プレートに 500 µL (1 × 10⁶ cells/well) あるいは 96 ウェル平底プレートに 80 µL (1.6 × 10⁵ cells/well) の細胞を播種する。

用量設定試験

13. 溶媒／媒体対照と比較して、細胞生存率 (CV) が 75% となる被験化学物質濃度である CV75 を求めるために、用量設定試験を実施する。CV75 値は、CD86/CD54 発現測定の被験化学物質曝露濃度を判断する際に用いる (段落 20~24 参照)。

被験化学物質および対照物質の調製

14. 被験化学物質および対照物質は、試験当日に調製する。h-CLAT の場合、被験化学物質を、溶媒／媒体の最初の選択として生理食塩水または培地に溶解するか、安定的に分散させる (段落 4 参照)。ここに挙げた 2 種類の溶媒／媒体に被験化学物質が不溶であるか安定した分散液にならない場合、次の選択としてジメチルスルホキシド (DMSO、純度 99%以上) に溶解、または安定的に分散させる。最終

濃度は、100 mg/mL（生理食塩水または培地の場合）または500 mg/mL（DMSOの場合）にする。十分な科学的根拠を提示できる場合は、上記以外の溶媒／媒体を使用してよい。最終的な溶媒／媒体における被験化学物質の安定性を考慮する必要がある。

15. 100 mg/mL（生理食塩水または培地の場合）または500 mg/mL（DMSOの場合）の被験化学物質のストック溶液から、次の希釀段階を実施する：

- 溶媒／媒体が生理食塩水または培地の場合：対応する溶媒／媒体を使用し、2倍の段階希釀で8ストック溶液（8濃度）を調製する。次にそのストック溶液を培養液でさらに50倍希釀する（作業用溶液）。1000 µg/mLがプレート中の最終的な最高濃度で、毒性を示さない場合、新たな細胞毒性試験を実施して最高濃度を求める。生理食塩水または培地で溶解または安定的に分散した被験化学物質のプレート中の最終濃度は、5000 µg/mLを超えてはならない。
- 溶媒／媒体がDMSOの場合：対応する溶媒／媒体を使用し、2倍の段階希釀で8ストック溶液（8濃度）を調製する。このストック溶液を培養液でさらに250倍希釀する（作業用溶液）。この濃度が毒性を示さない場合であっても、プレート中の最終濃度は、1000 µg/mLを超えてはならない。

最後に、プレートに THP-1 細胞懸濁液と同量の作業用溶液を加えることで（段落 17 参照）、被験化学物質濃度はさらに2倍希釀される（通常、プレートの最終濃度の範囲は7.81～1000 µg/mL）。

16. h-CLAT に用いる溶媒／媒体対照は、培養液（被験化学物質が培地または生理食塩水のいずれかに溶解または安定的に分散する場合（段落 4 参照））または DMSO（被験化学物質が DMSO に溶解または安定的に分散する場合）で、プレート中の最終濃度は 0.2%のみで試験を行う。段落 15 の作業用溶液に関しての説明と同じ希釀を行う。

被験化学物質および対照物質の適用

17. 段落 15 および 16 に記載の培養液または作業用溶液を、24 ウェル、または 96 ウェル平底プレート（段落 12 参照）で、調製した細胞懸濁液と 1:1 (v/v) で混合する。次に、処理したプレートを 5% CO₂ 存在下、37°C で 24 ± 0.5 時間インキュベートする。被験化学物質とのインキュベーションに先立ち、例えば、プレートをシールすることにより、揮発性の被験化学物質の蒸発、および被験化学物質によるウェル間の交差汚染を回避するよう留意する (20)。

ヨウ化プロピジウム (PI) 染色

18. 曝露から 24 ± 0.5 時間経過後、細胞をサンプルチューブへ移し、遠心分離により採取する。上清を捨て、残った細胞を 200 µL (96 ウェルの場合)、または 600 µL (24 ウェルの場合) の 0.1%ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝生理食塩水（染色用緩衝液）に再懸濁する。細胞懸濁液 200 µL を 96 ウェル丸底プレート (96 ウェルの場合) またはマイクロチューブ (24 ウェルの場合) に移し、200 µL (96 ウェルの場合) または 600 µL (24 ウェルの場合) の染色用緩衝液で 2 度洗浄する。最後に、細胞を染色用緩衝液 (400 µL など) で再懸濁し、PI 溶液 (20 µL など) を添加する（この場合、PI の最終濃度は 0.625 µg/mL）。例えば、補遺 II の習熟度確認物質の試験により、別の染色が PI と同様の結果を示す場合、7-アミノアクチノマイシン D (7-AAD)、トリパンブルーなどの他の細胞毒性マーカーを使用することが可能である。

フローサイトメトリーによる細胞毒性測定と CV75 値の算出

19. PI の細胞内への取り込みは、捕捉チャンネル FL-3 でフローサイトメトリーを用いて分析する。合計 1 万個の生細胞 (PI 陰性) を観察する。細胞生存率は、フローサイトメータ解析プログラムにより、以下の式を用いて算出される。細胞生存率が低い場合は、死細胞を含む最大 3 万個の細胞からなるデータが必要である。あるいは、分析開始後 1 分間で得られるデータを取得する。

$$\text{細胞生存率} = \frac{\text{生細胞数}}{\text{観察総細胞数}} \times 100$$

CV75 値（段落 13 参照）、すなわち THP-1 細胞の 75%が生細胞である（25%細胞毒性）濃度は、以下の式を用いて対数線形補間ににより算出する：

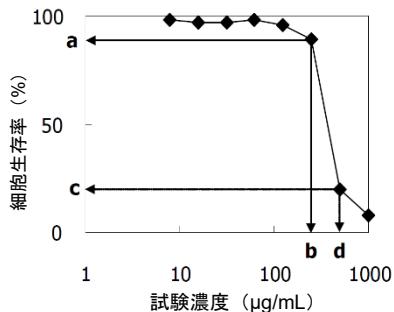
$$\text{Log CV75} = \frac{(75 - c) \times \text{Log}(b) - (75 - a) \times \text{Log}(d)}{a - c}$$

ここで

a は、75%超の最小の細胞生存率

c は、75%未満の最大の細胞生存率

b および d は、細胞生存率 a および c でのそれぞれの濃度



CV75 値を求める他のアプローチについては、（例えば、習熟度確認物質の試験により）結果に影響を与えないということが証明されれば使用することができる。

CD86/CD54 発現測定

被験化学物質および対照物質の調製

20. 適切な溶媒／媒体（生理食塩水、培地、または DMSO；段落 14 参照）を用いて、被験化学物質を溶解または安定的に分散する。まず、被験化学物質を用量設定試験（段落 19 参照）で求めた 1.2 × CV75 の 100 倍（生理食塩水または培地の場合）、または 500 倍（DMSO の場合）に相当する濃度に希釈する。CV75 を求めることができない場合（すなわち、十分な細胞毒性が用量設定試験で認められない場合）、各溶媒／媒体で調製した被験化学物質の可溶最高濃度、または安定的に分散される最高濃度

を開始濃度として用いる。プレート中の最終濃度が、5000 µg/mL（生理食塩水または培地の場合）、または1000 µg/mL（DMSO の場合）を超えないように留意する。次に、対応する溶媒／媒体を用いて1.2倍の段階希釈を行い、h-CLAT（用量調節の例は DB-ALM プロトコル番号 158 を参照）で試験されるストック溶液（ $100 \times 1.2 \times CV75$ から $100 \times 0.335 \times CV75$ （生理食塩水または培地の場合）または $500 \times 1.2 \times CV75$ から $500 \times 0.335 \times CV75$ （DMSO の場合）の範囲の8濃度）を調製する。次にそのストック溶液をさらに培養液中で50倍（生理食塩水または培地の場合）、または250倍（DMSO の場合）に希釈する（作業用溶液）。この作業用溶液は、最終的にはプレート中でさらに2倍に希釈され、曝露されることになる。細胞生存率に関して、結果が段落29および30に記載の許容基準を満たしていない場合は、一層正確なCV75を求めるために、再度、用量設定試験を行う場合がある。24ウェルプレートだけが、CD86/CD54発現測定に使用可能であるということに留意する。

21. 溶媒／媒体対照を、段落16の記載の通りに調製する。h-CLATに用いる陽性対照はDNCB（段落11参照）とし、DMSOでストック溶液を調製する。また、ストック溶液について段落20の記載の通りに希釈する。DNCBは、CD86/CD54発現測定の陽性対照として、プレート中で1種類の最終濃度（通常4.0 µg/mL）で使用する。プレートでDNCB濃度4.0 µg/mLを得るために、DMSOを用いて2 mg/mLのDNCBストック溶液を調製し、さらに8 µg/mLの作業用溶液にするため、培養液で250倍に希釈する。また、各試験施設で求めたDNCBのCV75も、陽性対照濃度として用いることができる。背景データがあり、ほぼ同じ実施許容基準を満たせば、これ以外の適切な陽性対照を用いることができる。陽性対照は、プレート中の最終濃度が5000 µg/mL（生理食塩水または培地の場合）、または1000 µg/mL（DMSO の場合）を超えてはならない。実施許容基準は、被験化学物質について記載された基準（段落29参照）と同一であるが、陽性対照は1種類の濃度で試験するため、最後の許容基準はあてはまらない。

被験化学物質および対照物質の適用

22. 被験化学物質および対照物質ごとに、予測結果を求めるのに1実験を要する。各実験では、CD86/CD54発現測定を独立して2回以上行う（段落26～28参照）。独立した各測定は、別の日に実施する。または、a)新たに被験化学物質のストック溶液と作業用溶液、および抗体溶液を独立して調製し、b)独立して採取した細胞を用いる（すなわち、細胞を異なる培養フラスコから採取する）場合は、同日に実施することができる。ただし、細胞は同じ継代数由来でもよい。作業用溶液（500 µL）として調製した被験化学物質および対照物質を、500 µLの細胞懸濁液（ 1×10^6 cells）と1:1の比率で混合し、細胞を段落20および21の記載の通り 24 ± 0.5 時間インキュベートする。独立した2回以上の実験で予測が得られるため、各測定では、被験化学物質と対照物質のそれぞれの濃度の反復数は1で十分である。

細胞染色および分析

23. 曝露から 24 ± 0.5 時間経過後、細胞を24ウェルプレートからサンプルチューブへ移し、遠心分離により採取する。次に1 mLの染色用緩衝液で2度洗浄する（必要であれば、追加の洗浄を行ってよい）。洗浄後、細胞を600 µLのブロッキング溶液（0.01%（w/v）グロブリン（Cohn分画II、III、ヒト：シグマ社、#G2388-10G）含有染色用緩衝液）で4°Cで15分間インキュベートする。ブロッキングのあと、細胞を96ウェル丸底プレートまたはマイクロチューブに、180 µLずつ3等分する。

24. 遠心分離後、50 µLのFITC標識抗CD86抗体、抗CD54抗体、またはマウスIgG1（アイソタイプ）抗体で、細胞を4°Cで30分間染色する。h-CLATのDB-ALMプロトコル番号158(18)に記載の抗体を、染色用緩衝液で3:25(v/v、CD86(BD-PharMingen、#555657；クローン：Fun-1)の場合)または3:50(v/v、CD54(DAKO、#F7143；クローン：6.5B5)、およびIgG1(DAKO、#X0927)の場合)に希釈して使用する。ここに挙げた抗体の希釈倍率は、最良のシグナル・ノイズ比を得られるものとして、試験法の開発者が規定した。試験法開発者の経験に基づき、抗体の蛍光強度は、通常、異なるロット

ト間で同じである。ただし、使用者は最適な濃度を決めるために、自身の試験施設の条件で抗体濃度を漸増減することができる。他の蛍光色素で標識された抗 CD86 および／または抗 CD54 抗体については、例えば、補遺 II 収載の習熟度確認物質の試験により、FITC 標識抗体と同様の結果をもたらすことが示されれば用いることができる。h-CLAT の DB-ALM プロトコル番号 158 (18) 記載の通り、抗体のクローンまたは供給元の変更は、結果に影響する場合があることに留意する。150 µL の染色用緩衝液で 2 回以上洗浄後、細胞を染色用緩衝液（例えば、400 µL）に再懸濁し、PI 溶液（例えば、最終濃度の 0.625 µg/mL を得るには 20 µL）、または別の細胞毒性マーカーの溶液（段落 18 参照）を添加する。CD86 および CD54 の発現量および細胞生存率を、フローサイトメトリーを用いて分析する。

データおよび報告

データの評価

25. CD86 および CD54 の発現量を、捕捉チャンネル FL-1 でフローサイトメトリーを用いて分析する。幾何平均蛍光強度（mean fluorescence intensity : MFI）に基づき、陽性対照（ctrl）細胞と化学物質処理細胞の CD86 および CD54 の相対蛍光強度（relative fluorescence intensity : RFI）を、次の式に従って算出する：

$$RFI = \frac{\text{化学物質処理細胞の MFI} - \text{化学物質処理アイソタイプ対照細胞の MFI}}{\text{溶媒／媒体処理対照細胞の MFI} - \text{溶媒／媒体処理アイソタイプ対照細胞の MFI}} \times 100$$

マウス IgG1（アイソタイプ）抗体で染色したアイソタイプ対照（ctrl）細胞の細胞生存率も、段落 19 記載の式に従って算出する。

予測モデル

26. CD86/CD54 発現測定で、ひとつの予測（陰性または陽性）結果を得るために、独立した 2 回以上の測定で各被験化学物質を試験する。2 回の独立した測定の 2 回とも、または 3 回の独立した測定の 2 回以上で、以下の条件の 1 つ以上を満たせば、h-CLAT による予測を陽性とみなし、それ以外の場合を陰性とみなす（図 1）：

- 細胞生存率 50% 以上の検討濃度 1 つ以上で、CD86 の RFI が 150% 以上である。
- 細胞生存率 50% 以上の検討濃度 1 つ以上で、CD54 の RFI が 200% 以上である。

27. 上記に基づき、最初の 2 回の測定が CD86 および／または CD54 のどちらも陽性である場合、h-CLAT による予測を陽性とみなし、3 回目の測定は必要ない。同様に、最初の 2 回の測定が両マーカーのどちらも陰性である場合、h-CLAT による予測を陰性（段落 30 の条項を十分に考慮の上）とみなし、3 回目の測定は不要である。ただし、1 種類以上のマーカー（CD86 または CD54）に関して最初の 2 回の測定が一致しない場合、3 回目の測定が必要となり、最終予測は結果の多い方（すなわち、3 回中 2 回認

めた結果)に基づく。ここで、2回の独立した測定で、1回が CD86 のみ陽性で、もう1回が CD54 のみ陽性の場合、3回目が必要となることに留意する。3回目が両マーカーとも陰性(以下 Nとする)である場合、h-CLATによる予測を陰性と判定する。一方、3回目の測定でどちらかのマーカーが陽性か、CD86 および CD54 とも陽性である場合、h-CLATによる予測を陽性と判定する。

28. h-CLAT で陽性と予測された被験化学物質の場合、CD86 では EC150、CD54 では EC200 の2つの効果濃度 (Effective Concentrations : EC)、すなわち被験化学物質が 150 または 200 の RFI を誘導する濃度が、状況に応じて求められる。このような EC 値を、確定方式(14)または IATA などの統合的アプローチの中で用いた場合(4)(5)(6)(7)(8)、感作性の強度の評価に貢献する場合がある(9)。EC 値を次の式により算出できる：

$$\text{EC150 (CD86 の場合)} = B_{\text{濃度}} + [(150 - B_{\text{RFI}}) / (A_{\text{RFI}} - B_{\text{RFI}}) \times (A_{\text{濃度}} - B_{\text{濃度}})]$$

ここで

$A_{\text{濃度}}$ は、RFI が 150 超 (CD86 の場合) または 200 超 (CD54 の場合) となる最低濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

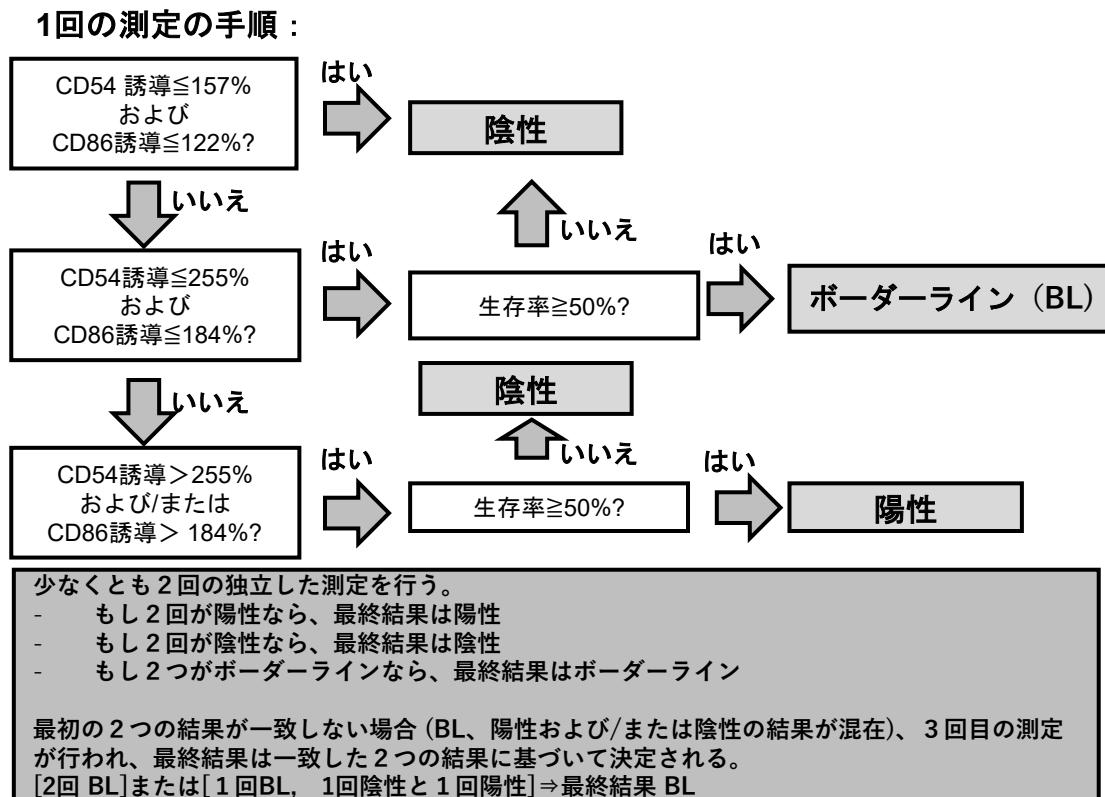
$B_{\text{濃度}}$ は、RFI が 150 未満 (CD86 の場合) または 200 未満 (CD54 の場合) となる最高濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

A_{RFI} は、RFI が 150 超 (CD86 の場合) または 200 超 (CD54 の場合) となる最低濃度での RFI

B_{RFI} は、RFI が 150 未満 (CD86 の場合) または 200 未満 (CD54 の場合) となる最高濃度での RFI

EC150 および EC200 の一層正確な値を得るために、独立した3回の CD86/CD54 発現測定が必要となる場合がある。その場合、EC150 および EC200 の最終的な値は、3回の独立した測定から算出した EC の中央値として求められる。独立した測定3回のうち2回のみ陽性基準(段落 26~27 参照)を満たす場合は、EC150 または EC200 に算出された2つの値の高い方の値が採用される。

図1：ボーダーラインの範囲とボーダーラインの結果を結論づけるための複数回の実行を考慮した h-CLAT 予測モデルのフローチャート



陽性分類の本来の閾値は、CD86 の誘導が 150%で、この閾値付近の統計学的な境界範囲は 122-184%、CD54 の誘導が 200%で、この閾値付近の統計学的な境界範囲は 157-255%である。

許容基準

29. h-CLAT を用いる場合、次の許容基準を満たすこと (22) (27)。

- 培地対照および溶媒／媒体対照の細胞生存率が 90%より高いこと。
- 溶媒／媒体対照において、CD86 および CD54 の RFI 値が陽性基準（CD86 の場合 150%以上、CD54 の場合 200%以上）を超えないこと。溶媒／媒体対照の RFI 値を、段落 25 記載の式を用いて算出する ((溶媒／媒体処理細胞の MFI - 溶媒／媒体処理アイソタイプ対照細胞の MFI) / ((培地) 対照処理対照細胞の MFI - (培地) 対照処理アイソタイプ対照細胞の MFI)) *100。
- 培地対照および溶媒／媒体対照のいずれも、CD86 および CD54 のアイソタイプ対照に対する MFI 比が 105%を超えること。
- 陽性対照 (DNB) では、CD86 および CD54 の RFI 値が陽性基準（CD86 の場合 150%以上、CD54 の場合 200%以上）を満たし、細胞生存率が 50%を超えること。

- 被験化学物質の場合、細胞生存率が各測定の少なくとも 4 つの試験濃度で 50% を超えること。
30. 陰性結果は、最高試験濃度（すなわち、段落 20 記載の段階希釈法に従って $1.2 \times CV_{75}$ ）において 90% 未満の細胞生存率を示す被験化学物質のみにあてはまる。 $1.2 \times CV_{75}$ での細胞生存率が 90% 以上の場合は、陰性結果を無効とする。このような場合、再度 CV_{75} を求め、用量設定をやり直すことが推奨される。生理食塩水（または培地、またはその他の溶媒／媒体）では 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、DMSO では 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または最高可溶濃度を、被験化学物質の最大試験濃度として用いる場合、細胞生存率が 90% を上回っても陰性結果が許容されることに留意する。

試験報告書

31. 試験報告書には以下の情報を含む。

被験化学物質

- 単一成分物質
 - 化学的識別情報、例えば IUPAC 名または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはそれ以外の識別に有用な情報
 - 外観、Log Kow、水への溶解度、DMSO への溶解度、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質
 - 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、試験前の処理（例えば、加温、粉碎）
 - 試験濃度
 - 入手可能な範囲の保存条件および安定性
 - 各被験化学物質に対する溶媒／媒体選択の妥当性
- 多成分物質、UVCB 物質および混合物
 - 入手可能な範囲の成分の化学的識別情報（上記参照）、純度、含有量および関連のある物理化学的性質（上記参照）などによるできる限りの成分の特性
 - 外観、水への溶解度、DMSO への溶解度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質
 - 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、試験前の処理（例えば、加温、粉碎）
 - 試験濃度
 - 入手可能な範囲の保存条件および安定性
 - 各被験化学物質に対する溶媒／媒体選択の妥当性

対照

- 陽性対照
 - 化学的識別情報、例えば IUPAC 名または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはそれ以外の識別に有用な情報
 - 外観、Log Kow、水への溶解度、DMSO への溶解度、分子量および入手可能な範囲で該当する場合、その他の関連する物理化学的性質
 - 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、試験前の処理（例えば、加温、粉碎）
- 試験濃度
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性
- 該当する場合、適切な実施許容基準であることを示す陽性対照結果の背景データ。
- 陰性対照および溶媒／媒体対照
 - 化学的識別情報、例えばIUPAC名またはCAS名、CAS番号、SMILESまたはInChIコード、構造式および／またはそれ以外の識別に有用な情報
 - 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
 - 本試験法ガイドラインに記載されていない別の対照溶媒／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質
 - 入手可能な範囲の保存条件および安定性
 - 各被験化学物質に対する溶媒／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住所
- 試験法の説明
- 細胞株、その保存条件および供給元（細胞株を入手した施設など）
- フローサイトメトリー（機種など）、機器の設定内容、グロブリン、抗体、ならびに細胞毒性マーカー
- 習熟度評価用物質の試験を用いた本試験法実施における実施施設の習熟度を立証するのに用いた手順および経時的な試験法の再現性を立証するのに用いた手順。これには、背景対照データおよび／または反応性確認の背景データなどがある。

試験許容基準

- 許容範囲と比較した、溶媒／媒体対照から得られた細胞生存率、MFI および RFI の値
- 許容範囲と比較した、陽性対照から得られた細胞生存率および RFI の値
- 試験物質の全試験濃度における細胞生存率

試験手順

- 測定実施数
- 被験化学物質の濃度、適用、曝露時間（推奨事項と異なる場合）
- 曝露期間（推奨事項と異なる場合）
- 評価および測定基準の記述
- 試験手順の修正があればその記述

結果

- 測定ごとに被験化学物質および陽性対照について得られた CV75 値（該当する場合）、個々の幾何平均 MFI 値、RFI 値、細胞生存率、EC150/EC200 値（該当する場合）のデータの一覧表、ならびに予測モデルに従って得られた被験化学物質の評価の提示

- 該当する場合、それ以外に関連する知見があればその記述

結果の考察

- h-CLAT を用いて得た結果の考察
- 他の関連情報が入手可能な場合、IATA の範囲内における試験結果の考察

結論

参考文献

1. Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006), Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767–773.
2. Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007), Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428-437.
3. EC EURL-ECVAM (2013), Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Accessible at: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
4. Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015), Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318-1332.
5. Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015), Evaluation of combinations of in vitro sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333-1347.
6. Bauch C, Kolle SN, Ramirez 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.
7. Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014), Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371-379.
8. Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, 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.
9. 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.
10. Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016), Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* DOI 10.1002/jat.3281.
11. Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012), Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150-60.
12. EC EURL ECVAM (2015), Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Accessible at: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
13. EC EURL ECVAM (2012), human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible at: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>

14. Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013), Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599-609.
15. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010), A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
16. 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.
17. Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010), The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. *AATEX* 15, 81-88.
18. DB-ALM (INVITTOX) (2014), Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Accessible at: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
19. Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008), Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. *AATEX* 13, 70-82.
20. Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010), The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. *AATEX* 15, 89-96.
21. OECD (2005), Guidance Document No.34 on “the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment”. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, 96 pp.
22. OECD (2012), The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PA RT1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PA RT1&docLanguage=En)
23. United Nations UN (2013), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/rev05/05files_e.html].
24. ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
25. Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008), Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. *AATEX* 13, 27-35.

補遺 I :用語の定義

正確度：試験法による結果と、一般的に認められた参考値との近さ。試験法の性能の尺度であり、妥当性の一側面である。この用語は、多くの場合、試験法の正確な結果の割合を意味する一致率と同義的に用いられる(21)。

AOP（有害性発現経路）：分子レベルのイニシャルイベントから検討対象の *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(22)。

CV75:細胞生存率が 75% を示す予測濃度。

EC150 : CD86 発現において、RFI 値が 150 を示す濃度。

EC200 : CD54 発現において、RFI 値が 200 を示す濃度。

フローサイトメトリー：液体で懸濁された細胞が、細胞およびその構成成分の特徴に応じて散乱する励起光の焦点を通って一度に 1 つずつ流れる細胞測定法。最初に光を吸収し、次に変化した周波数を放出するよう、多くの場合、細胞が蛍光マーカーで標識される。

有害性：生物、系統、または（亜）集団がある物質に曝露された場合、悪影響を引き起こす可能性がある物質固有の性質または状態のこと。

IATA（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有害性の識別（可能性）、有害性の特徴付け（強度）および／または安全性評価（可能性／強度および曝露）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、有害性の可能性、リスクや、さらに目的を絞った最小限となる試験の必要性について、規制上の意思決定情報を与える。

培地対照：試験系のすべての構成成分を含む未処理の複製。溶媒／媒体と試験系との相互作用の有無を判定するため、この試料を被験化学物質処理試料およびそれ以外の対照試料とともに処理する。

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。

単一成分物質：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：定量的組成に、2 つ以上の主要成分が濃度 10% (w/w) 以上および 80% (w/w) 未満で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されることにある。

陽性対照：試験系のすべての構成成分を含み、陽性反応を誘導することが知られている物質を用いて実施する試験部分。陽性対照反応の経時的变化を評価できるように、陽性反応の大きさが過剰であってはならない。

プレハプテン：非生物変換を通じて感作性物質となる化学物質。

プロハプテン：皮膚感作性を生じるために、酵素による活性化を要する化学物質。

相対蛍光強度（RFI）：溶媒／媒体で処理した細胞の MFI との比較によって得られる、化学物質で処理した細胞の幾何平均蛍光強度 (MFI) の相対値。

妥当性：試験と検討対象の影響との関係と、試験が特定の目的にとって意義や有用性があるかを示す用

語。試験が試験対象となる生物学的影響を正確に測定または予測できる程度を示す。妥当性は、試験法の正確度（一致度）も考慮する(21)。

信頼性：同じプロトコルを用いて試験法を実施したときに得られる経時的な施設内および施設間再現性的程度を表す尺度。施設内再現性および施設間再現性ならびに施設内反復性の算出により評価される(21)。

測定：溶媒／媒体対照および陽性対照とともに同時に検討される 1 つ以上の被験化学物質からなる一組の試験。

感度：すべての陽性化学物質や活性化学物質のうち、試験によって正確に分類されるものの割合。分類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事項である(21)。

染色用緩衝液：0.1%ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝生理食塩水。

溶媒／媒体対照：用いる溶媒／媒体などの試験系のすべての構成成分を含むが、被験化学物質を含まない未処理試料のこと。同じ溶媒／媒体に溶解、または安定的に分散した被験化学物質で処理した試料について、ベースラインの反応を確認するために用いられる。培地対照を同時に用いた試験の場合、本試料は、溶媒／媒体と試験系との相互作用の有無も示す。

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。分類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事項である(21)。

物質：自然の状態または製造過程で得られる化学元素とその化合物のことをいい、その製品の安定性を保つために必要な添加物や、その使用工程から派生する不純物は含まれるが、その物質の安定性に影響を及ぼすこととも、その組成を変化させることもなく分離する可能性のある溶媒は除く。

被験化学物質：「被験化学物質」という用語は、試験対象であることをいう場合に用いる。

国際連合の化学物質の分類および表示に関する世界調和システム (UN GHS)：人々（雇用主、労働者、輸送担当者、消費者、緊急時対応者など）および環境を守るために、有害作用に関する情報を伝達することを目的として、物理学上、健康上および環境上の有害性の種類およびレベルの基準に従って化学物質（物質および混合物）の分類法を提案するとともに、ピクトグラム・注意喚起語・有害性情報・注意書き・化学物質安全性データシートなどの対応する伝達要素を取り扱うシステムである(23)。

UVCB：組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生体物質。

妥当な試験法：特定の目的に対し十分な妥当性および信頼性があるとみなされ、科学的に健全な原則に基づいている試験法。ある試験法が絶対的な意味で妥当というのではなく、規定した目的に関して妥当であるにとどまる(21)。

補遺Ⅱ：習熟度評価用の物質

本試験法ガイドライン 442E の付属書に従って試験法を日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、表 1 で推奨される 10 物質について、h-CLAT により期待される予測結果を正確に入手し、習熟度確認 10 物質中 8 物質以上について、それぞれの基準範囲内に含まれる CV75 値、EC150 値および EC200 値を確認することにより技術的習熟度を立証すること。習熟度評価用の物質は、皮膚感作性の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、その物質が市販品であること、高品質の *in vivo* 参照データが入手可能であること、および h-CLAT により得られた高品質の *in vitro* データが入手可能であることに基づく。公表されている参照データが h-CLAT で利用可能であることを含む (3) (14)。

表 1： h-CLAT の技術的習熟度確認の立証に推奨される物質

習熟度評価用の物質	CAS 番号	物理的状態	<i>In vivo</i> における予測 ¹	CV75 基準範囲 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ²	CD86 の h-CLAT の結果 (EC150 の基準範囲 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)) ²	CD54 の h-CLAT の結果 (EC200 の基準範囲 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)) ²
2,4-ジニトロクロロベンゼン	97-00-7	固体	感作物質（非常に強い）	2-12	陽性 (0.5~10)	陽性 (0.5~15)
4-フェニレンジアミン	106-50-3	固体	感作性物質（強い）	5-95	陽性 (< 40)	陰性 (> 1.5) ³
硫酸ニッケル	10101-97-0	固体	感作性物質（中等度）	30-500	陽性 (< 100)	陽性 (10~100)
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）	30-400	陰性(>10) ³	陽性 (10~140)
R (+)-リモネン	5989-27-5	液体	感作性物質（弱い）	>20	陰性 (>5) ³	陽性 (< 250)
イミダゾリジニル尿素	39236-46-9	固体	感作性物質（弱い）	25-100	陽性 (20~90)	陽性 (20~75)
イソプロパノール	67-63-0	液体	非感作性物質	>5000	陰性 (> 5000)	陰性 (> 5000)
グリセロール	56-81-5	液体	非感作性物質	>5000	陰性 (> 5000)	陰性 (> 5000)
乳酸	50-21-5	液体	非感作性物質	1500-5000	陰性 (> 5000)	陰性 (> 5000)
4-アミノ安息香酸	150-13-0	固体	非感作性物質	>1000	陰性 (> 1000)	陰性 (> 1000)

略語 : CAS 番号 = Chemical Abstracts Service Registry Number

¹ *In vivo* における有害性（および強度）の予測結果は、LLNA データに基づく (3) (14)。*In vivo* における強度は、ECETOC により提唱された基準を用いている (24)。

² 既存の測定値に基づく (13) (25)。

³ 既存の陰性結果の大部分は本マーカーで得られた。従って陰性結果が主に予測される。記載の範囲は、認められた数少ない既存の陽性結果に基づき定義された。陽性結果が得られた場合、EC 値は報告された基準範囲内でなければならない。

付属書 2 : In vitro 皮膚感作性 : U937 細胞株活性化試験 (U-SENS™)

最初に考慮すべき事項および限界

1. U-SENS™は、単球および樹状細胞 (DC) が活性化されて生じる細胞表面マーカー (CD86) のヒト組織球性リンパ腫細胞株 U937 における発現について、感作性物質に対する曝露による変化を定量することができる (1)。これにより、U937 細胞株の細胞表面マーカーである CD86 の発現レベル測定値を用いて、皮膚感作性物質か非皮膚感作性物質かの識別を支援する。
2. U-SENS™は、L'Oréal 社が主導したバリデーション試験で評価され (2)、その後、歐州動物実験代替法評価センター (EURL ECVAM) 科学諮問委員会 (ESAC) による独立したピアレビューで評価された (3)。入手可能な証拠と規制当局およびステークホルダーからの情報をすべて考慮し、U-SENS™は、有害性の分類および表示を目的に、感作性物質と非感作性物質との識別を支援するために IATA の一環として用いることが EURL ECVAM (4) によって推奨されている。皮膚感作性に関して IATA に用いられるデータ統合体系的アプローチや個々の情報源を報告するガイダンス文書の中で、OECD は現時点で、さまざまな検査戦略や予測モデルを報告するいくつもの症例研究を検討している。このうちのひとつが、U-SENS アッセイに基づくものである (5)。背景データや既存の妥当なヒトデータ (6) などの他の情報を U-SENS™データと併用した例も、別の文献に報告されている (4) (5) (7)。
3. U-SENS™は、細胞培養技術とフローサイトメトリー分析の経験がある施設への技術移管が可能であることが確認されている。本試験法に見込まれる予測結果の再現性は、同一施設内および複数の施設間でそれぞれ、90%および 84%であった (8)。バリデーション試験 (8) および発表された他の研究 (1) から得られたすべての結果によると、LLNA の結果と比較した場合、皮膚感作性物質 (UN GHS 区分 1) と非感作性物質とを識別する正確度は 86% (N = 166)、感度は 91% (118/129)、特異度は 65% (24/37) であった。ヒトでの結果と比較した場合、皮膚感作性物質 (UN GHS 区分 1) と非感作性物質とを識別する正確度は 77% (N = 101)、感度は 100% (58/58)、特異度は 47% (20/43) であった。U-SENS™の偽陰性結果の予測を LLNA と比較すると、皮膚感作性が高い化学物質 (UN GHS 細区分 1A) よりも、皮膚感作性が低いか中程度の化学物質 (UN GHS 細区分 1B) に認められる可能性が高い (1) (8) (9)。総合すると、上記情報は U-SENS™が皮膚感作性の有害性を識別するのに有用であることを示している。ただし、U-SENS™は、IATA に基づく他の情報を併用し、「はじめに」の段落 7 および 8 の条項に従って検討されるべきであることから、U-SENS™を単独の試験法として算出した正確度の値は指標にすぎない。さらに、動物を用いない皮膚感作性試験法を評価する場合、LLNA 試験もその他の動物試験も、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ると、U-SENS™は、さまざまな有機官能基、物理化学的特性、皮膚感作性強度 (in vivo 試験で判定される) や、皮膚感作性を生じることがわかっている一連の反応メカニズム (マイケル受容体、シップ塩基形成、アシリル転移剤、2 分子的求核置換 [SN2] または芳香族求核置換反応 [SNAr]) などにまたがる被験化学物質 (保存料、界面活性剤、活性剤、色素などの化粧品成分を含む) に適用可能であることが示された (1) (8) (9) (10)。U-SENS™は、適切な溶媒／媒体 (段落 13 参照) に可溶であるか安定した分散液 (被験化学物質が沈殿することも、溶媒／媒体から分離して異相を示すこともないコロイドまたは懸濁液) となる被験化学物質に適用可能である。プレハップテン (酸化により活性化される物質) やプロハップテン (酵素 P450 を介するなど酵素による活性化を要する物質) とされるデー

タセットの化学物質を、U-SENS™によって正しく予測することができた(1)(10)。膜破壊物質は、非特異的 CD86 発現増加を生じることから、偽陽性となることがあり、*in vivo*での基準分類に関連して、偽陽性 7 件中 3 件が界面活性剤であった(1)。界面活性剤に陰性結果を認めた場合、被験化学物質が非感作性物質であるとの判断を支援するものの、界面活性剤に認めた上記のような陽性結果の判断は慎重を要する。蛍光被験化学物質は U-SENS™で評価できるが(1)、フルオレセイン・イソチオシアネート (FITC) またはヨウ化プロピジウム (PI) と同じ波長の強い蛍光被験化学物質は、フローサイトメトリーによる検出を干渉するため、FITC 標識抗体（偽陰性の可能性）または PI（細胞生存率測定不能）を用いて正確に評価できない。このような場合、補遺 II 収載の習熟度確認物質による FITC 標識抗体または PI（段落 18 参照）と同様の結果をもたらすことが示される場合に限り、他の蛍光色素で標識された抗体、または他の細胞毒性マーカーを用いることができる。上記を踏まえて、界面活性被験化学物質の陽性結果や、強い蛍光被験化学物質の陰性結果を、示されている限界や、IATA の枠組み内の他の情報源に照らして解釈する必要がある。他の特定のカテゴリーに属す被験化学物質に U-SENS™を適用できない証拠がある場合、U-SENS™をそのようなカテゴリーに属す物質に用いるべきではない。

5. 上記の通り、U-SENS™は、皮膚感作性物質と非感作性物質との識別を支援することができる。一方、IATAなどの統合的アプローチの中で用いられた場合、感作性の強度の評価が可能な場合もある。とはいっても、U-SENS™の成績が、どのように強度評価に情報を与えるのかを特定するには、ヒトデータに基づいた一層の研究が必要である。

6. 用語の定義を補遺 I に示す。

試験の概要

7. U-SENS™は、被験化学物質曝露 45 ± 3 時間後に、ヒト組織球性リンパ腫細胞株である U937 細胞の CD86 細胞表面マーカー発現の変化を定量する *in vitro* 試験である。CD86 表面マーカーは、典型的な U937 活性化マーカーのひとつである。CD86 は、共刺激分子であることがわかっており、T 細胞プライミングに重要な役割を担う单球活性化を再現すると考えられる。典型的にはフルオレセイン・イソチオシアネート (FITC) で標識された抗体で細胞を染色したあと、CD86 細胞表面マーカー発現の変化をフローサイトメトリーで測定する。CD86 細胞表面マーカー発現のアップレギュレーションが、細胞毒性に達しない濃度で生じているか評価するため、同時に細胞毒性も（例えば、PI を用いて）測定する。溶媒／媒体対照との比較で CD86 細胞表面マーカーの刺激指数 (S.I.) を算出し、予測モデル（段落 19 参照）に用いて、感作性物質と非感作性物質との識別を支援する。

習熟度の立証

8. 試験法ガイドライン 442E の付属書に記載されている試験法を日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、Good *in vitro* Method Practices (11) に準拠して補遺 II 収載の習熟度確認用の 10 物質を用いて技術的習熟度を立証する。さらに、本試験法使用者は、反応性のチェック（段落 11 参照）と、陽性対照および溶媒／媒体対照（段落 15～16 参照）により得られたデータの背景データベースを保管し、このようなデータを用いて、実施施設での本試験法の再現性が経時的に維持されていることを確認する。

手順

9. 本試験法は、U-SENS™に関する動物実験代替法データベースサービス (DB-ALM) プロトコル番号 183 に基づく(12)。実施施設で U-SENS™を導入し使用する場合、標準操作手順 (SOP) を用いる必要がある。例えば補遺 II の習熟度確認物質の試験によって同様の結果をもたらすことが示されれば、U-

SENS™自動測定システムを使用してよい。U-SENS™の主要な構成要素および手順について以下に記す。

細胞の調製

10. U-SENS™の実施には、ヒト組織球性リンパ腫細胞株 U937 (13) を使用する。American Type Culture Collection (ATCC) のような十分な適正資格をもつ細胞バンクから、細胞（クローン CRL1593.2）入手すること。

11. U937 細胞は室温 37°C、5% CO₂ の加湿雰囲気下で、10% ウシ胎児血清 (FCS) 、2 mM L-グルタミン、100 単位/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した RPMI-1640 培地（完全培地）で培養する。U937 細胞は、2~3 日に 1 回、定期的に密度 1.5×10^5 cells/mL または 3×10^5 cells/mL で播種する。細胞密度が 2×10^6 cells/mL を超えてはならない。また、トリパンブルー色素排除法で測定した細胞生存率が 90% 以上でなければならない（解凍後第一継代には適用されない）。試験に使用する前に、細胞の全ロット、FCS や抗体について反応性のチェックを行い、適正であることを判断する。細胞の反応性チェックは、陽性対照であるピクリルスルホン酸 (2,4,6-トリニトロ-ベンゼン-スルホン酸 : TNBS) (CAS 番号 2508-19-2、純度 99%) および陰性対照である乳酸 (LA) (CAS 番号 50-21-5、純度 85% 以上) を用いて、解凍から 1 週間以上後に実施する。反応性のチェックには、2 つの対照のそれぞれに、6 種類の最終濃度を検討する (TNBS : 1, 12.5, 25, 50, 75, 100 µg/mL および LA : 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/mL)。完全培地に溶解した TNBS が、陽性および濃度依存性の CD86 反応を生じ（陽性の濃度で CD86 S.I. ≥ 150、そのとの CD86 S.I. の増加）、完全培地に溶解した LA が CD86 の陰性反応を生じる必要がある（段落 21 参照）。2 回の反応性チェックで適正と判断された細胞ロットのみを試験で使用する。細胞は、解凍後、最長 7 週間にわたって増殖させることが可能である。継代数は 21 回を超えてはならない。反応性チェックは、段落 18~22 に記載の手順に従って実施する。

12. 試験では、 3×10^5 cells/mL または 6×10^5 cells/mL の密度で U937 細胞を播種し、それ 2 日間または 1 日間、培養フラスコで前培養する。十分な科学的妥当性が提示される他に、例えば、補遺 II 収載の習熟度確認物質の試験により、同様の結果をもたらすことが示されれば、ここに挙げたもの以外の前培養条件を使用してもよい。試験当日、培養フラスコから採取した細胞を、 5×10^5 cells/mL で新たな培養液に再懸濁する。次に、96 ウェル平底プレートに 100 µL (最終細胞密度 0.5×10^5 cells/well) の細胞を播種する。

被験化学物質および対照物質の調製

13. 試験実施前に被験化学物質の溶解性を確認する。この目的のために、被験化学物質を、溶媒の第一候補として完全培地を用いて、50 mg/mL の濃度で溶解または安定的に分散させる。完全培地溶媒／媒体に被験化学物質が不溶である場合、第二候補としてジメチルスルホキシド (DMSO、純度 99% 以上) に溶解、または安定的に分散させる。被験化学物質が溶媒／媒体に溶解する場合、試験用に、最終濃度 0.4 mg/mL になるように被験化学物質を完全培地に溶解する。化学物質が DMSO にしか溶解しない場合は、濃度 50 mg/mL で化学物質を溶解する。十分な科学的根拠を提示できる場合は、上記以外の溶媒／媒体を使用してよい。最終的な溶媒／媒体における被験化学物質の安定性を考慮する必要がある。

14. 被験化学物質および対照物質は、試験当日に調製する。U-SENS™では用量設定試験を行わないため、初回測定で、6 種類の最終濃度 (1, 10, 20, 50, 100 および 200 µg/mL) となるように、完全培地または 0.4% DMSO 含有培地のいずれかからなる溶媒／媒体で調製し、実験を行う。2 回目以降の測定では、完全培地に 0.4 mg/mL または DMSO に 50 mg/mL の被験化学物質溶液から開始し、少なくとも 4 種類の作業用溶液（少なくとも 4 種類の濃度）を、対応する溶媒／媒体を用いて調製する。作業用溶液は最終

的に、プレートの作業用溶液と等量の U937 細胞懸濁液（上記段落 11 参照）を添加することによりさらに 2 倍に希釈されて処置に用いられる (12)。ここから先の測定のための濃度（少なくとも 4 種類の濃度）を、これまでの測定結果に基づいて選択する (8)。使用しうる最終濃度は、1、2、3、4、5、7.5、10、12.5、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180 および 200 µg/mL である。最高最終濃度は 200 µg/mL である。1 µg/mL で CD86 陽性値を認めた場合、陽性閾値を超える CD86 を生じない被験化学物質濃度をみつけるために、次に 0.1 µg/mL を評価する。CD86 陽性濃度反応を認めた場合、測定ごとに、EC150 (CD86 陽性閾値である 150% に達する化学物質の濃度、段落 19 参照) を求める。被験化学物質が、陽性 CD86 反応を生じるが、濃度依存性を示さない場合、U-SENS™ DB-ALM プロトコル番号 183 (12) に記載されているように、EC150 を算出しても意味がないと考えられる。測定ごとに、CV70 (細胞毒性閾値 70% に達する化学物質濃度、段落 19 参照) をできる限り求める (12)。CD86 増加の濃度反応効果を検討するため、使用しうる濃度からいずれかの濃度を選択する。このとき、EC150 (または CD86 陰性無細胞毒性濃度の最高値) と CV70 (または可能な最高濃度 [200 µg/mL]) との間に均等に分散するように選択する。測定あたり 4 種類以上の濃度を検討し、比較のため、このうち 2 種類以上を前回の測定に用いた濃度とする。

15. U-SENS™ に用いる溶媒／媒体対照は、完全培地（被験化学物質が溶解または安定的に分散する場合）（段落 4 参照）または 0.4%DMSO 含有完全培地（被験化学物質が DMSO に溶解または安定的に分散する場合）である。

16. U-SENS™ に用いる陽性対照は、完全培地で調製した TNBS（段落 11 参照）である。TNBS は CD86 発現測定の陽性対照として、プレートの最終濃度 1 種類 (50 µg/mL) で、細胞生存率が 70% を上回ることを確認する。TNBS がプレート中に 50 µg/mL となるようにするには、1 M の TNBS ストック溶液 (293 mg/mL) を完全培地で調製し、2,930 倍希釈することで 100 µg/mL の作業用溶液を得る。乳酸 (LA, CAS 50-21-5) を、陰性対照物質として完全培地中に 200 µg/mL となるよう溶解したものを使用する (0.4 mg/mL ストック溶液から)。各測定のプレートごとに、完全培地無処置対照、溶媒／媒体対照、陰性対照および陽性対照を 3 回反復で作成する (12)。背景データがあり、ほぼ同じ実施許容基準を満たせば、これ以外の適切な陽性対照を用いることができる。測定許容基準は、被験化学物質について記載された基準（段落 12 参照）と同一である。

被験化学物質および対照物質の適用

17. 段落 14～16 に記載の溶媒／媒体対照または作業用溶液を、調製した細胞懸濁液（段落 12 参照）と、1:1 (v/v) で 96 ウエル平底プレートで混合する。次に、処理したプレートを 5% CO₂ 存在下、37°C で 45 ± 3 時間インキュベートする。インキュベートの前に、プレートを半透膜でシールし、揮発性の被験化学物質の蒸発やウェル間での被験化学物質の交差汚染を回避する (12)。

細胞の染色

18. 曝露から 45 ± 3 時間経過後、細胞を V 底マイクロタイヤープレートへ移し、遠心分離により採取する。溶解に関する悪影響を、処理 45 ± 3 時間後（細胞染色前）に結晶または液滴が顕微鏡下に認められることと定義する。上清を捨て、残った細胞を 100 µL の氷冷 5% ウシ胎児血清含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)（染色用緩衝液）で 1 回洗浄する。遠心分離後、細胞を 100 µL の染色用緩衝液で再懸濁し、遮光下に 4°C で 30 分間、5 µL (0.25 µg) の FITC 標識抗 CD86 抗体またはマウス IgG1 (アイソタイプ) 抗体を用いて染色する。U-SENS™ DB-ALM プロトコル番号 183 (12) に記載の抗体を使用すること (CD86 : BD-PharMingen #555657 クローン : Fun-1 または Caltag/Invitrogen # MHCD8601 クローン : BU63 ; およ

び IgG1 : BD-PharMingen #555748 または Caltag/Invitrogen # GM4992)。試験法開発者の経験に基づき、抗体の蛍光強度は、通常、異なるロット間で同じである。反応性チェックに合格したものであれば、別のクローンや供給業者の抗体をアッセイに使用してもよい（段落 11 参照）。ただし、使用者が自身の試験施設の条件で抗体濃度を漸増減し、最適な濃度を決める必要がある。蛍光色素で標識された抗 CD86 抗体などの他の検出システムについては、例えば、補遺 II 収載の習熟度確認物質の試験により、FITC 標識抗体と同様の結果をもたらすことが示されれば用いることができる。100 µL の染色用緩衝液で 2 回、100 µL の氷冷 PBS で 1 回洗浄後、細胞を氷冷 PBS に再懸濁し（試料を手動で試験管ごとに分析する場合は 125 µL、自動サンプループレートを用いる場合は 50 µL）、PI 液を添加する（最終濃度 3 µg/mL）。補遺 II の習熟度確認物質の試験により、別の染色が PI と同様の結果を示す場合、他の細胞毒性マーカー（例えば 7-アミノアクチノマイシン D (7-AAD) またはトリパンブルー）を使用することが可能である。

フローサイトメトリー分析

19. CD86 の発現量および細胞生存率を、フローサイトメトリーを用いて分析する。細胞を、対数尺度を用いたサイズ (FSC) および顆粒含有量 (SSC) のドットプロットで示す。これにより、first gate R1 の集団を明確に特定し、デブリを排除することができる。各ウェルにつき、gate R1 に合計 10,000 細胞を得ることを目標にする。同じ R1 gate から得た細胞を、FL3 または FL4/SSC ドットプロットで示す。ヨウ化プロピジウム陰性細胞集団を選択する別の gate R2 を設けることによって、生細胞を明確にする (FL3 または FL4 チャンネル)。細胞生存率は、フローサイトメータ解析プログラムにより、以下の式を用いて算出される。細胞生存率が低い場合は、死細胞を含む最大 2 万個の細胞からなるデータを取得する。あるいは、分析開始後 1 分間で得られるデータを取得する。

$$\text{細胞生存率} = \frac{\text{生細胞数}}{\text{観察総細胞数}} \times 100$$

次に、(R1 のうち) R2 にゲートされた生細胞中の FL1-陽性細胞の割合を測定する。細胞表面の CD86 発現を、生細胞 (R2) にゲートされた FL1/SSC ドットプロットで分析する。

完全培地/IgG1 ウェルの場合、分析マーカーを主要集団に近接して設定し、完全培地対照の IgG1 が目標ゾーン 0.6~0.9% にあるようにする。

色に関する干渉を、FITC 標識 IgG1 ドットプロットのシフトと定義する (IgG1 FL1 幾何平均 S.I. ≥ 150%)。

対照細胞（無処理または 0.4%DMSO）および化学物質曝露細胞の CD86 の刺激指数 (S.I.) を、次式に基づいて算出する：

$$\text{S.I.} = \frac{\text{被験化学物質処理 CD86}^+ \text{細胞の\%} - \text{被験化学物質処理 IgG1}^+ \text{細胞の\%}}{\text{対照 CD86}^+ \text{細胞の\%} - \text{対照 IgG1}^+ \text{細胞の\%}} \times 100$$

無処理対照 IgG1⁺細胞の%：無処理生細胞中の、分析マーカーで規定される（許容範囲 0.6%以上 1.5%未満、段落 22 参照）FL1 陽性 IgG1 細胞の割合を指す。

IgG1⁺/CD86⁺の対照／被験化学物質処理細胞の%：対照／被験化学物質処理生存細胞における分析マーカ

一を動かさずに測定した FL1-陽性 IgG1/CD86 細胞の割合を指す。

データおよび報告

データの評価

20. 下記パラメータを U-SENS™試験法で求める：CV70 値、具体的には、U937 の細胞生存率が 70% を示す被験化学物質濃度（30%細胞毒性）。EC150 値、具体的には、CD86 の刺激指数（S.I.）が 150% を示す被験化学物質濃度。

CV70 を、以下の式を用いて対数線形補間により算出する：

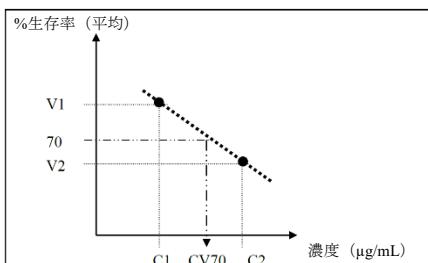
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

ここで

V1 は、細胞生存率が 70%以上となる最小の生存率

V2 は、細胞生存率が 70%未満となる最大の生存率

C1 および C2 は、それぞれ V1 および V2 の細胞生存率を示す被験化学物質濃度。



CV70 値を求める他のアプローチについては、（例えば、習熟度確認物質の試験により）結果に影響を与えないということが証明されれば使用することができる。

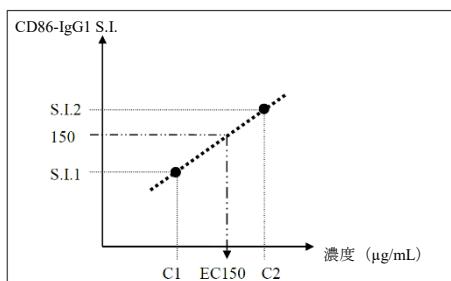
EC150 は、以下の式を用いて対数線形補間により算出する：

$$EC150 = C1 + [(150 - S.I.1) / (S.I.2 - S.I.1) * (C2 - C1)]$$

ここで

C1 (μg/mL) は、CD86 S.I.値が 150%未満の最大被験化学物質濃度 (S.I.1)

C2 (μg/mL) は、CD86 S.I.値が 150%以上の最小被験化学物質濃度 (S.I.2)



下記について、EC150 値および CV70 値を算出する

- 測定ごと： EC150 値および CV70 値を、CD86 増加の濃度反応効果を検討するツールとして使用する（段落 14 参照）
- 平均生存率に基づいて、全体での CV70 を求める (12)
- DC86 値の平均 S.I.に基づいて、U-SENS™を用いて陽性と予測される被験化学物質に対する全体での EC150 を求める（段落 21 参照） (12)

予測モデル

21. CD86 発現測定では、被験化学物質の各測定は少なくとも 4 濃度、少なくとも 2 回の独立した測定（別日に実施）を行って、ひとつの予測（陰性または陽性）を得る。

- CD86 の S.I. 値が、検査に供した細胞毒性のない（細胞生存率が 70% 以上）すべての濃度で 150% 未満であり、しかも結果に悪影響がない場合（細胞毒性、溶解性：段落 18 参照、または色：悪影響が検出される非細胞毒性濃度にかかわらず段落 19 参照）、U-SENS™のその測定の結論を陰性（これ以後、N と記載する）と判断する。陰性以外のすべての場合：CD86 の S.I. 値が 150% 以上である、および／または、悪影響を認める場合、U-SENS™のその測定における結論を陽性（これ以後、P と記載する）と判断する。
- 少なくとも 2 回の独立した測定において陰性であれば U-SENS™における予測を陰性（N）とする（図 1）。最初の 2 回の測定がどちらも陰性（N）であれば、U-SENS™予測を陰性と判断し、3 回目の測定は行う必要がない。
- 少なくとも 2 回の独立した測定が陽性（P）であれば、U-SENS™における予測を陽性とする（図 1）。最初の 2 回の測定がどちらも陽性（P）であれば、U-SENS™における予測を陽性とし、3 回目の測定は行う必要がない。
- 用量設定試験を行わないことから、最初の測定で、細胞毒性のない最も高い濃度のみで、CD86 の S.I. 値が 150% 以上であった場合を例外とする。この測定結果を「確定的でない」（Not Conclusive : NC）と判断し、濃度を追加（最高無毒性濃度と最低細胞毒性濃度との間－段落 20 参照）して、追加の測定を実施する必要がある。測定結果が NC とされた場合、少なくとも別途 2 回実施する。2 回目と 3 回目の結果が分かれた場合（独立に N および／または P）は 4 回目の測定を行う（図 1）。2 回目以降の測定では、細胞毒性のない最も高い濃度のみで CD86 が 150% 以上であったとしても、その測定を陽性と判断する。その理由は、当該被験化学物質に対して濃度設定を補正したことによる。最終予測は、3 回または 4 回の測定それぞれの結果の多い方に基づく（3 回のうち 2 回、4 回のうち 2 回）（図 1）。

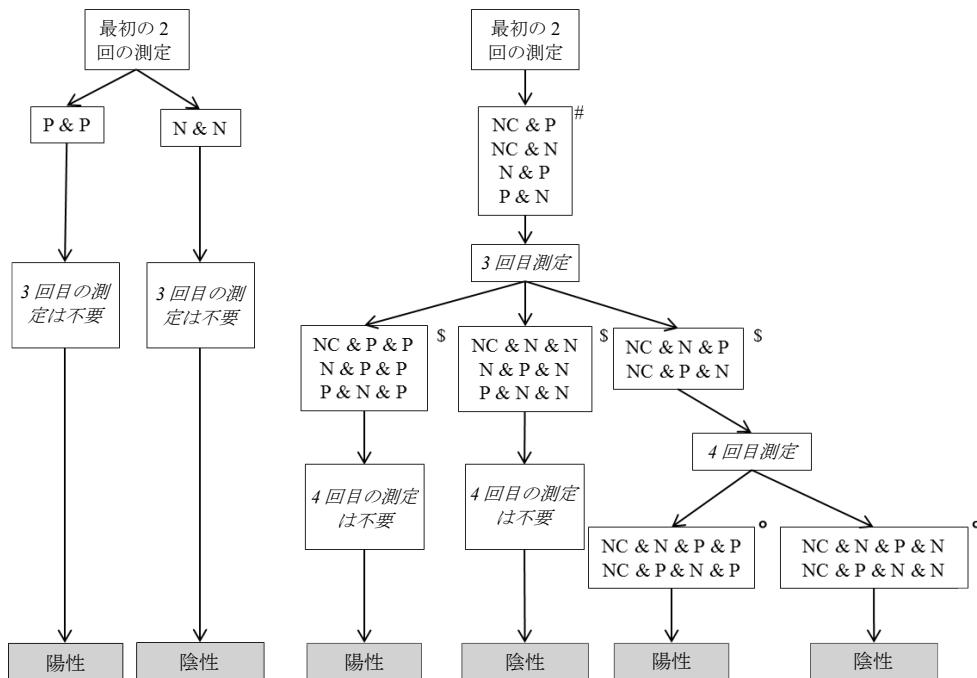


図 1： U-SENS™に用いられる予測モデル。U-SENS™による予測は、IATA の枠組みの中で、また、段落 4 の条項および「はじめに」の段落 7、8 および 9 に従って検討すること。

N：測定で、CD86 陽性でないほか、悪影響も認めない。

P：測定で、CD86 陽性である、および／または、悪影響を認める。

NC：確定的でない。最初の測定で、細胞毒性のない最高濃度のみで CD86 が陽性であった場合は「確定的でない」。

#：最初の測定とのみ結びついた「確定的でない（NC）」個別の結論を認めた場合、独立の 3 回の測定のうち 2 回以上からなる陽性（P）または陰性（N）の結論を得るために、自動的に 3 回目の測定が必要となる。

\$：上記ボックスに示す最初の 2 回の測定で得た結果に基づいて実施された計 3 回の測定結果の組合せを当該ボックスに示す。

◦：上記ボックスに示す最初の 3 回の測定結果に基づいて実施された計 4 回の測定結果の組合せを当該ボックスに示す。

許容基準

22. U-SENS™を用いる場合、次の許容基準を満たす必要がある (12)。

- 45 ± 3 時間の被験化学物質曝露終了時に、3 回反復の無処置 U937 の細胞生存率の平均が 90% より高く、CD86 発現にドリフトが認められない。無処置 U937 細胞の CD86 基礎発現率が 2% 以上 25% 以下である。
- DMSO を溶媒に用いた場合、DMSO 媒体対照の妥当性を、無処置細胞と比較した DMSO S.I. を求めることによって評価し、3 回反復の細胞生存率の平均が 90% より高くなければならない。DMSO 媒体対照 3 回反復の CD86 S.I. の平均が、無処置 U937 細胞 3 回反復の CD86 S.I. の平均の 250% 未満であれば、DMSO 媒体対照は妥当である。
- 無処置 U937 細胞の IgG1 値について、3 回測定のうち少なくとも 2 回が 0.6% 以上 1.5% 未満である場合に、測定を妥当であると考える。
- 同時に測定した陰性対照（乳酸）について、3 回反復のうち 2 回反復以上が陰性（CD86 S.I. が

150%未満)で、無細胞毒性(細胞生存率70%以上)である場合に、同時に測定した陰性対照を妥当であると考える。

- 陽性対照(TNBS)の3回反復中2回反復が陽性(CD86 S.I.が150%以上)で、無細胞毒性(細胞生存率70%以上)である場合に、陽性対照(TNBS)を妥当と考える。

試験報告書

23. 試験報告書には以下の情報を含む。

被験化学物質

- 単一成分物質
 - 化学的識別情報、例えばIUPAC名またはCAS名、CAS番号、SMILESまたはInChIコード、構造式および／またはそれ以外の識別に有用な情報
 - 外観、完全培地への溶解度、DMSOへの溶解度、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質
 - 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、試験前の処理(例えば、加温、粉碎)
 - 試験濃度
 - 入手可能な範囲の保存条件および安定性
 - 各被験化学物質に対する溶媒／媒体選択の妥当性
- 多成分物質、UVCB物質および混合物：
 - 入手可能な範囲の成分の化学的識別情報(上記参照)、純度、含有量および関連のある物理化学的性質(上記参照)などによるできる限りの成分の特性
 - 外観、完全培地への溶解度、DMSOへの溶解度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質
 - 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、試験前の処理(例えば、加温、粉碎)
 - 試験濃度
 - 入手可能な範囲の保存条件および安定性
 - 各被験化学物質に対する溶媒／媒体選択の妥当性

対照

- 陽性対照
 - 化学的識別情報、例えばIUPAC名またはCAS名、CAS番号、SMILESまたはInChIコード、構造式および／またはそれ以外の識別に有用な情報
 - 外観、DMSOへの溶解度、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質

- 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、試験前の処理（例えば、加温、粉碎）
- 試験濃度
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性
- 該当する場合、適切な実施許容基準であることを示す陽性対照結果の背景データ。
- 陰性対照および溶媒／媒体対照
 - 化学的識別情報、例えば IUPAC 名または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはそれ以外の識別に有用な情報
 - 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
 - 本試験法ガイドラインに記載されていない別の対照溶媒／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質
 - 入手可能な範囲の保存条件および安定性
 - 各被験化学物質に対する溶媒／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住所
- 試験法の説明
- 細胞株、その保存条件および供給元（細胞株を入手した施設など）
- フローサイトメトリー（機種など）、機器の設定内容、抗体、ならびに細胞毒性マーカー
- 習熟度評価用物質の試験を用いた本試験法実施における実施施設の習熟度を立証するのに用いた手順および経時的な試験法の再現性を立証するのに用いた手順。これには、背景対照データおよび／または反応性確認の背景データなどがある。

試験許容基準

- 許容範囲と比較した、溶媒／媒体対照から得られた細胞生存率および CD86 S.I. 値
- 許容範囲と比較した、陽性対照から得られた細胞生存率および S.I. 値
- 試験物質の全試験濃度における細胞生存率

試験手順

- 測定実施数
- 被験化学物質の濃度、適用、曝露時間（推奨事項と異なる場合）
- 曝露期間
- 評価および測定基準の記述
- 試験手順の修正があればその記述

結果

- 測定ごとに被験化学物質および陽性対照について得られた CV70 値（該当する場合）、S.I.、細胞生存率、EC150 値（該当する場合）のデータの一覧表、ならびに予測モデルに準拠した被験化学物質の評価の提示
- 該当する場合、それ以外に関連する知見があればその記述

結果の考察

- U-SENS™ を用いて得られた結果の考察
- 他の関連情報が入手可能な場合、IATA の範囲内における試験結果の考察

結論

参考文献

1. Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.
2. EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Accessible at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations
3. EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No. 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28178 EN; doi 10.2787/815737. Available at: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].
4. EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28553 EN; doi 10.2760/588955. Available at: [https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing].
5. Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
6. OECD (2016). Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No. 256, [ENV/JM/MONO\(2016\)29](#). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm].
7. 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.
8. Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol. In Vitro* 30, 373-382.
9. Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klarić, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.
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, 1683-1696.
11. OECD. (2017). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD%20Draft%20GIVIMP_v05%20-%20clean.pdf].
12. DB-ALM (2016). Protocol no. 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Accessible at: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

13. Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.
14. OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
15. United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Available at: [http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf].
16. 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/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
17. ECETOC (2003). Technical Report No. 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Available at: [https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf].

補遺 I :用語の定義

正確度：試験法による結果と、一般的に認められた参考値との近さ。試験法の性能の尺度であり、妥当性の一侧面である。この用語は、多くの場合、試験法の正確な結果の割合を意味する一致率と同義的に用いられる(14)。

AOP（有害性発現経路）：分子レベルのイニシャルイベントから検討対象の *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(15)。

CD86 濃度反応：陽性濃度 (CD86 S.I. ≥ 150) の確認後にさらに高い CD86 S.I. を示す濃度を認めた場合、濃度依存性（濃度反応性）がある。

CV70：細胞生存率が 70% を示す予測濃度。

ドリフト：ドリフトを、i) 無処置対照実験第 3 回反復の修正%CD86⁺値が、無処置対照実験第 1 回反復および第 2 回反復の修正%CD86⁺値の平均の 50% を下回る場合、および ii) 陰性対照実験第 3 回反復の修正%CD86⁺値が、陰性対照実験の第 1 回反復および第 2 回反復の修正%CD86⁺値の平均の 50% を下回る場合と定義する。

EC150：CD86 発現において、150% S.I. を示す予測濃度。

フローサイトメトリー：液体で懸濁された細胞が、細胞およびその構成成分の特徴に応じて散乱する励起光の焦点を通って一度に 1 つずつ流れる細胞測定法。最初に光を吸収し、次に変化した周波数を放出するよう、多くの場合、細胞が蛍光マーカーで標識される。

有害性：生物、系統、または（亜）集団がある物質に曝露された場合、悪影響を引き起こす可能性がある物質固有の性質または状態のこと。

IATA（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有害性の識別（可能性）、有害性の特徴付け（強度）および／または安全性評価（可能性／強度および曝露）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、有害性の可能性、リスクや、さらに目的を絞った最小限となる試験の必要性について、規制上の意思決定情報を与える。

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。

単一成分物質：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：定量的組成に、2 つ以上の主要成分が濃度 10% (w/w) 以上および 80% (w/w) 未満で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されることにある。

陽性対照：試験系のすべての構成成分を含み、陽性反応を誘導することが知られている物質を用いて実施する試験部分。陽性対照反応の経時的变化を評価できるように、陽性反応の大きさが過剰であってはならない。

プレハプテン：酸化などの非生物的な変換を通じて感作性物質となる化学物質。

プロハプテン：皮膚感作性を生じるために、酵素による活性化を要する化学物質。

妥当性：試験と検討対象の影響との関係と、試験が特定の目的にとって意義や有用性があるかを示す用語。試験が試験対象となる生物学的影響を正確に測定または予測できる程度を示す。妥当性は、試験法の正確

度（一致度）も考慮する（14）。

信頼性：同じプロトコルを用いて試験法を実施したとき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。施設内再現性および施設間再現性ならびに施設内反復性の算出により評価される（14）。

測定：溶媒／媒体対照および陽性対照とともに同時に検討される1つ以上の被験化学物質からなる一組の試験。

感度：すべての陽性化学物質や活性化学物質のうち、試験によって正確に分類されるものの割合。分類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事項である（14）。

S.I.：刺激指数。溶媒で処理した細胞との比較によって得られる化学物質で処理した細胞の幾何平均蛍光強度の相対値。

溶媒／媒体対照：用いる溶媒／媒体などの試験系のすべての構成成分を含むが、被験化学物質を含まない未処理試料のこと。同じ溶媒／媒体に溶解、または安定的に分散した被験化学物質で処理した試料について、ベースラインの反応を確認するために用いられる。培地対照を同時に用いた試験の場合、本試料は、溶媒／媒体と試験系との相互作用の有無も示す。

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。分類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事項である（14）。

染色用緩衝液：5%ウシ胎児血清含有リン酸緩衝生理食塩水。

物質：自然の状態または製造過程で得られる化学元素とその化合物のことをいい、その製品の安定性を保つために必要な添加物や、その使用工程から派生する不純物は含まれるが、その物質の安定性に影響を及ぼすことなく、その組成を変化させることなく分離する可能性のある溶媒は除く。

被験化学物質：「被験化学物質」という用語は、試験対象であることをいう場合に用いる。

国際連合の分類および表示に関する世界調和システム（UN GHS）：人々（雇用主、労働者、輸送担当者、消費者、緊急時対応者など）および環境を守るために、有害作用に関する情報を伝達することを目的として、物理学上、健康上および環境上の有害性の種類およびレベルの基準に従って化学物質（物質および混合物）の分類法を提案するとともに、ピクトグラム・注意喚起語・有害性情報・注意書き・化学物質安全性データシートなどの対応する伝達要素を取り扱うシステムである（16）。

UVCB：組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生体物質。

妥当な試験法：特定の目的に対し十分な妥当性および信頼性があるとみなされ、科学的に健全な原則に基づいている試験法。ある試験法が絶対的な意味で妥当というのではなく、規定した目的に関して妥当であるにとどまる（14）。

補遺 II : 習熟度評価用の物質

本試験法ガイドライン 442E の付属書に従って試験法を日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、表 1 で推奨される 10 物質について、U-SENS™により期待される予測結果を正確に入手し、習熟度確認 10 物質中 8 物質以上について、それぞれの基準範囲内に含まれる CV70 値、EC150 値を確認することにより技術的習熟度を立証すること。習熟度評価用の物質は、皮膚感作性の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、その物質が市販品であること、高品質の *in vivo* 参照データが入手可能であること、および U-SENS™により得られた高品質の *in vitro* データが入手可能であることに基づく。公表されている参照データが U-SENS™で利用可能であることを含む (1) (8)。

表 1 : U-SENS™の習熟度確認の立証に推奨される物質

習熟度評価用の物質	CAS 番号	物理的状態	<i>In vivo</i> における予測 ¹	U-SENS™ 液媒／媒体	U-SENS™ CV70 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) の基準範囲 ²	U-SENS™ EC150 の基準範囲 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ²
4-フェニレンジアミン	106-50-3	固体	感作性物質（強い）	完全培地 ³	<30	陽性 (≤ 10)
ピクリルスルホン酸	2508-19-2	液体	感作性物質（強い）	完全培地	>50	陽性 (≤ 50)
マレイン酸ジエチル	141-05-9	液体	感作性物質（中等度）	DMSO	10-100	陽性 (≤ 20)
レゾルシノール	108-46-3	固体	感作性物質（中等度）	完全培地	>100	陽性 (≤ 50)
桂皮アルコール	104-54-1	固体	感作性物質（弱い）	DMSO	>100	陽性 (10-100)
4-アリルアニソール	140-67-0	液体	感作性物質（弱い）	DMSO	>100	陽性 (< 200)
サッカリン	81-07-2	固体	非感作性物質	DMSO	>200	陰性 (> 200)
グリセロール	56-81-5	液体	非感作性物質	完全培地	>200	陰性 (> 200)
乳酸	50-21-5	液体	非感作性物質	完全培地	>200	陰性 (> 200)
サリチル酸	69-72-7	固体	非感作性物質	DMSO	>200	陰性 (> 200)

略語 : CAS 番号 = Chemical Abstracts Service Registry Number

¹ *In vivo* における有害性（および強度）の予測結果は、LLNA データに基づく (1) (8)。*In vivo* における強度は、ECETOC により提唱された基準を用いている (17)。

² 既存の測定値に基づく (1) (8)。

³ 完全培地 : 10% ウシ胎児血清、2 mM L-グルタミン、100 単位/mL ペニシリンおよび 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを添加した RPMI-1640 培地 (8)。

付属書 3 : In vitro 皮膚感作性 : インターロイキン-8 レポーター遺伝子アッセイ (IL-8 Luc アッセイ)

最初に考慮すべき事項および限界

1. 細胞表面マーカーの発現を解析するアッセイとは異なり、IL-8 Luc アッセイは、樹状細胞 (DC) が活性化すると生じるサイトカインである IL-8 発現の変化を定量する (1) (2)。THP-1 由来 IL-8 レポーター細胞株 (ヒト急性单球性白血病細胞株である THP-1 から樹立した THP-G8) を感作性物質に曝露させ、IL-8 発現を測定する (2) (3) (4)。ここで、ルシフェラーゼの発現を用いて、皮膚感作性物質と非感作性物質の識別を支援する。2023 年に、固有の生存マーカーを用いた細胞毒性の評価に基づいて、一部の難溶性物質に対する本試験法の適用性を高めるように改訂した予測モデルを用いて、本試験法が更新された (5)。
2. IL-8 Luc 法は、日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) 、経済産業省 (METI) および日本動物実験代替法学会 (JSAAE) が実施したバリデーション試験で評価されたのち (5)、JaCVAM および厚生労働省 (MHLW) の主導の下に、代替試験法国際協力 (ICATM) の支援を得て、独立したピアレビューを受けた (6)。入手可能な証拠と規制当局およびステークホルダーからの情報をすべて考慮すると、IL-8 Luc アッセイは、有害性の分類および表示を目的に、感作性物質と非感作性物質を識別するのに、試験および評価に関する統合的アプローチ (IATA) の一環として有用であると考えられる。IL-8 Luc アッセイデータと他の情報との併用に関する例が、文献に報告されている (3) (7)。
3. IL-8 Luc アッセイは、細胞培養とルシフェラーゼ測定の経験がある施設への技術移管が可能であることが確認されている。施設内再現性および施設間再現性はそれぞれ、87.7% および 87.5% であった (5)。バリデーション試験 (5) および他の公表論文 (3) (4) (8) のデータは、LLNA と比較した IL-8 Luc アッセイの性能を示している。このような試験で、IL-8 Luc アッセイは化学物質 143 種中 130 種を陽性または陰性、13 種を確定的でないと判定した。皮膚感作性物質 (UN GHS 区分 1) と非感作性物質 (UN GHS 区分なし) とを識別する IL-8 Luc アッセイの正確度は 83.6% (109/130) 、感度 92.0% (92/100) 、特異度 56.7% (17/30) であった。以下 (段落 6) に示す界面活性剤、無水物やルシフェラーゼを妨害する化学物質など、適用範囲外の物質を除くと、IL-8 Luc アッセイの性能は、感度 93.9% (92/98) 、特異度 68.0% (17/25) 、正確度 88.6% (109/123) であった。Urbisch et al. (7) のヒトデータによれば、IL-8 Luc アッセイは化学物質 90 種中 84 種を陽性または陰性、6 種を確定的でないと判定した。その性能は感度 89.7% (52/58) 、特異度 50.0% (13/26) 、正確度 77.4% (65/84) であった。適用範囲に収まらない物質を除外すると、IL-8 Luc アッセイは化学物質 84 種中 78 種を陽性または陰性、6 種を確定的でないと判定し、正確度 82.1% (64/78) 、感度 89.7% (52/58) および 60.0% (12/20) であった。 $\text{LogK}_{\text{ow}} < 3.5$

の化学物質に対する IL-8 Luc アッセイの性能と、 $\text{LogK}_{\text{ow}} \geq 3.5$ の化学物質に対する IL-8 Luc アッセイの性能との差を検討したところ、 $\text{LogK}_{\text{ow}} \geq 3.5$ で IL-8 Luc アッセイの感度が低下しないことが示された(8)。

4. IL-8 Luc アッセイでの偽陰性の予測は、皮膚感作性が高い化学物質 (UN GHS 細区分 1A) よりも、皮膚感作性が低い／中等度の化学物質 (UN GHS 細区分 1B) に認められる可能性が高い(3)(4)(8)。総合すると、上記情報は、IL-8 Luc アッセイが皮膚感作性を識別するのに有用であることを示している。IL-8 Luc アッセイは、IATAに基づく他の情報を併用し、「はじめに」の段落 7 および 8 の条項に従って検討されるべきであることから、IL-8 Luc アッセイを単独の試験法として算出した正確度の値は指標にすぎない。さらに、動物を用いない皮膚感作性試験法を評価する場合、LLNA 試験もその他の動物試験も、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。

5. 現在入手可能なデータによると、IL-8 Luc アッセイは、さまざまな有機官能基、反応メカニズム、皮膚感作性の強度 (in vivo 試験で判定される)、物理化学的特性にまたがる被験化学物質に適用可能であることが示されている(3)(4)(5)。IL-8 Luc アッセイはまた、多成分物質および混合物の試験に技術的に適用可能である。しかし、X-VIVO™ 15 に 20 mg/mL で完全に溶解しない混合物が非感作物質とされた場合、他の化学物質の毒性の陰に隠れていた感作性物質があるかもしれない。混合物を検討する際には、上記の他に、「はじめに」の段落 9 に記載した in vitro 感作性試験に関する一般的な懸念を考慮に入るべきである。

6. バリデーション試験で、無水物の偽陰性率が高かった。さらに、細胞株の代謝能が低い(9)ことや実験条件から、プロハプテン (代謝活性化を要する物質) およびプレハプテン (空気酸化により活性化される物質) が、IL-8 Luc アッセイ陰性結果を示す場合がある。ただし、プレ／プロハプテンと考えられる場合、陰性結果を慎重に解釈する必要があるものの、IL-8 Luc アッセイは、IL-8 Luc アッセイデータセットにあるプレハプテン 11 種中 11 種、プロハプテン 6 種中 6 種、プレ／プロハプテン 8 種中 5 種を正しく判断した(5)(7)。プレハプテンおよびプロハプテンを検出するための動物を用いない 3 種類の方法 (DPRA、KeratinoSens™ および h-CLAT) に対する最近の包括的レビュー(10)と、IL-8 Luc アッセイに用いる THP-G8 細胞が h-CLAT に用いられる THP-1 に由来する細胞株であるという事実に基づくと、IL-8 Luc アッセイも、他の方法と組み合わせて、プレハプテンおよびプロハプテンを検出するための動物を用いない方法の感度向上にも寄与する可能性がある。これまでに検討した界面活性剤は、種類 (陽イオン性、陰イオン性または非イオン性) に関わらず、(偽) 陽性結果を生じている。最後に、ルシフェラーゼを阻害する化学物質は、活性／測定値を混乱させ、見かけ上の発光阻害や発光増加を生じる可能性がある(11)。例えば、1 μM を超える濃度のフィトエストロゲンは、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の過剰活性化により、別のルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイでの発光信号を阻害することが報告されている。このため、フィトエストロゲンや、ルシフェラーゼレポーター遺伝子のフィトエストロゲン様活性化を生じると考えられる化合物が高濃度に存在する場合に測定したルシフェラーゼ発現レベルは、慎重に検討する必要がある(12)。上記に基づき、界面活性剤、無水物、ルシフェラーゼ阻害物質は、IL-8 Luc アッセイの適用範囲外にある。他の特定のカテゴリーに属す被験化学物質に IL-8 Luc アッセイを適用できない証拠がある場合、IL-8 Luc アッセイをそのようなカテゴリーに属す物質に用いるべきではない。

7. 上記の通り、IL-8 Luc アッセイは、皮膚感作性物質と非感作性物質との識別を支援することができる。別的情報源と併用した場合に、IL-8 Luc アッセイの成績が強度評価に貢献しうるかどうかを明ら

かにするには、ヒトデータに基づいた一層の研究が必要である。

8. 用語の定義および略語を表 1 および補遺 I に示す。

試験の概要

9. IL-8 Luc アッセイは、アメリカ培養コレクション（米国バージニア州マナッサス）から得たヒト単球性白血病細胞株 THP-1 を利用している。この細胞株を用いて、東北大学医学部皮膚科は、THP-1 由来 IL-8 レポーター細胞株である THP-G8 を樹立した。これは、Stable Luciferase Orange (SLO) および Stable Luciferase Red (SLR) からなるルシフェラーゼ遺伝子をそれぞれ、IL-8 プロモータおよびグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) プロモータの下流に導入したものである(2)。これによって、感作性化学物質に曝露した細胞の IL-8 および GAPDH の活性の指標として、既知の光発生ルシフェラーゼ基質からの発光を検出することで、ルシフェラーゼ遺伝子誘導の定量測定が可能になる。この二重色アッセイシステムは、IL-8 プロモータの遺伝子発現をみる橙色発光ルシフェラーゼ (*Rhagophthalmus ohbai* の SLO ; $\lambda_{max} = 580$ nm) (13) と、内部対照プロモータである GAPDH の遺伝子発現をみる赤色発色ルシフェラーゼ (*Phrixothrix hirtus* の SLR; $\lambda_{max} = 630$ nm) (14) からなる。この 2 種類のルシフェラーゼがホタル D ルシフェリンと反応して異なる色を発する。光学フィルターを用いてアッセイ混合物からの発光を分離し、1 段階反応で発光を同時に測定する (15) (補遺 II)。また、GAPDH mRNA は中等度に多く、普遍的に発現する。これは、異なる時間や実験操作後でも発現が一定であるため、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応の内部対照として、一部の実験系でよく使用されている (16) (17) (18)。GAPLA の阻害値 (Inh-GAPLA) は細胞生存率の優れたマーカーであり、フローサイトメトリーによる細胞生存率の測定に一般的に使用されるマーカーであるヨウ化プロピジウム (PI) 排除細胞と強い相関があることが証明されている。Inh-GAPLA が 0.8 未満であれば被験化学物質が細胞毒性であることを示し、これは化学物質が培地内で溶解したことを示唆している。従って、この分析法を用いて、難溶性化学物質に対する曝露を検証し、確定的でない結果の数を減らすことができる (8)。

10. THP-G8 細胞を、被験化学物質で 16 時間処理したあと、IL-8 プロモータ活性を示す SLO ルシフェラーゼ活性 (SLO-LA) と、GAPDH プロモータ活性を示す SLR ルシフェラーゼ活性 (SLR-LA) を測定する。略語を把握しやすくするため、SLO-LA を IL8LA、SLR-LA を GAPLA と名付ける。表 1 に、IL-8 Luc アッセイにおけるルシフェラーゼ活性にまつわる用語を説明する。測定値を用いて、次のものを算出する。IL8LA/GAPLA で求められる正規化 IL8LA (nIL8LA) ; 被験化学物質で処理した THP-G8 細胞の nIL8LA の 4 回反復測定値の算術平均と、無処置 THP-G8 細胞の nIL8LA の反復測定値の算術平均の比で求められる nIL8LA の誘導倍率 (Ind-IL8LA) ; 被験化学物質で処理した THP-G8 細胞の GAPLA の 4 回反復測定値の算術平均値と、無処置 THP-G8 細胞の GAPLA の反復測定値の算術平均値の比で求められる Inh-GAPLA であり、これを細胞毒性指標として使用する。

表 1. IL-8 Luc アッセイのルシフェラーゼ活性の用語の説明

略語	定義
GAPLA	GAPDH プロモータ活性を示す SLR ルシフェラーゼ活性
IL8LA	IL-8 プロモータ活性を示す SLO ルシフェラーゼ活性
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	被験化学物質で処理した THP-G8 細胞の nIL8LA / 無処理細胞の nIL8LA
Inh-GAPLA	被験化学物質で処理した THP-G8 細胞の GAPLA / 無処理細胞の GAPLA
CV05	Inh-GAPLA が 0.05 未満となる被験化学物質の最低濃度。
PI reduction	被験化学物質に曝露した THP-G8 細胞における PI 排除細胞の% / 被験化学物質曝露のない THP-G8 細胞における PI 排除細胞の%。

習熟度の立証

11. 試験法ガイドライン 442E の付属書に記載されている試験法を日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、Good *in vitro* Method Practices (19) に準拠して補遺 III 収載の習熟度確認用の 9 物質を用いて技術的習熟度を立証する。さらに、本試験法使用者は、反応性のチェックと、陽性対照および溶媒／媒体対照により得られたデータの背景データベースを保管し、このようなデータを用いて、実施施設での本試験法の再現性が経時的に維持されていることを確認する。

手順

12. IL-8 Luc アッセイの標準操作手順 (SOP) を利用できる。試験を実施する際にはこれを採用する必要がある (5)。本試験を実施する施設は、OECD テンプレートの条件に従って物質移動合意書 (MTA) に署名することにより、Tottori Bioscience Promotion Organization (鳥取県) から遺伝子組換え THP-G8 細胞株を入手することができる。この下の段落に、IL-8 Luc アッセイの主要構成要素と手順を記載する。

細胞の調製

13. THP-G8 細胞株を、IL-8 Luc アッセイの実施に使用する（段落 9 および 12 参照）。受領したら、細胞を増殖して（2~4 代）、均質ストック細胞として凍結保存する。このストック細胞を、最大 12 代まで、または 6 週間までにわたり増殖することができる。増殖に用いる培地は、10% ウシ胎児血清 (FBS)、抗生物質／抗真菌物質溶液 (100 U/mL ペニシリシン-G、100 µg/mL ストレプトマイシンおよび 0.25 µg/mL アムホテリシン B 含有 0.85% 生理食塩水) (GIBCO Cat# 15240-062 など)、0.15 µg/mL ピューロマイシン (CAS : 58-58-2 など) および 300 µg/mL G418 (CAS : 108321-42-2 など) を含有する RPMI-1640 培地である。

14. 試験に使用する前に、反応性のチェックを行い、適正であることを判断する。反応性のチェックは、解凍後1~2週間または2~4代を経たのち、陽性対照である4-ニトロベンジルブロミド(4-NBB)(CAS: 100-11-8、純度 99%)および陰性対照である乳酸(CAS: 50-21-5、純度 85%以上)を用いて実施する。4-NBBがInd-IL8LA陽性反応(≥ 1.4)、一方、乳酸がInd-IL8LA陰性反応(< 1.4)を示す必要がある。この条件を満たさない場合は、新しい凍結保存バイアルを使用するほか、4-NBBの濃度を再確認することが推奨される。反応性チェックで適正と判断された細胞のみを試験で使用する。反応性チェックは、段落21~23に記載の手順に従って実施する。

15. 試験では、 $2\sim 5 \times 10^5$ cells/mLの密度でTHP-G8細胞を播種し、48~96時間にわたって培養フラスコで前培養する。試験当日、培養フラスコから採取した細胞を、抗生物質を含まない10%FBS含有RPMI-1640で洗浄したのち、抗生物質を含まない10%FBS含有RPMI-1640に 1×10^6 cells/mLで再懸濁する。次に、96ウェル平底黒色プレート(Costar Cat# 3603など)に50 µL(5×10^4 cells/well)の細胞を播種する。

被験化学物質および対照物質の調製

16. 被験化学物質および対照物質は、試験当日に調製する。IL-8 Lucアッセイには、市販されている無血清培地であるX-VIVO™ 15(Lonza²、04-418Q)に、最終濃度20 mg/mLになるよう被験化学物質を溶解する。マイクロ遠心チューブに入れた被験化学物質20 mgにX-VIVO™ 15を加えて(化学物質溶解性と無関係に)1 mLとし、vortexミキサーにかけたあと、約20°Cの周囲温度で最高8 rpmのスピードのロータを用いて30分間振盪する。それでも固体の化学物質が溶解しない場合は、化学物質が完全に溶解するか安定的に分散するまで、チューブを超音波にあてる。被験化学物質がX-VIVO™ 15に溶解する場合、この溶液をX-VIVO™ 15を用いて5倍に希釈し、被験化学物質のX-VIVO™ 15ストック溶液として使用する(4 mg/mL)。被験化学物質がX-VIVO™ 15に20 mg/mLで完全には溶解しない場合、混合物を再度、30分以上振盪したのち、15,000 rpm(約20,000 g)で5分間遠心する。得られた上清を被験化学物質のX-VIVO™ 15ストック溶液として使用する。DMSO、水や培地など、他の溶媒を使用する場合は、科学的根拠を提示すること。化学物質の溶解手順の詳細を、補遺Vに示す。段落17~22に記載のX-VIVO™ 15溶液を、96ウェル平底黒色プレート(段落15参照)で調製した細胞懸濁液と1:1(v/v)で混合する。

17. 最初の試験測定は、細胞毒性濃度を特定し、化学物質の皮膚感作性の可能性を検討することを目的とする。96ウェルプレート(Costar Cat# EW-01729-03など)を用いて、被験化学物質のX-VIVO™ 15ストック溶液の2倍希釈系列を、X-VIVO™ 15を用いて作成する(補遺V参照)。次に、50 µL/ウェルの希釈溶液を、96ウェル平底黒色プレートに入った50 µL細胞懸濁液に加える。これにより、X-VIVO™ 15に可溶性の被験化学物質の場合、被験化学物質の最終濃度は0.002~2 mg/mLとなる(補遺V)。20 mg/mLでX-VIVO™ 15に不溶性の被験化学物質の場合、 $2\sim 2^{10}$ の希釈倍率のみを検討する。ただし、被験化学物質の実際の最終濃度は不明のままであり、X-VIVO™ 15ストック溶液中の被験化学物質の飽和濃度に依存する。

² https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/IT/en/Culture-Media-and-Reagents/p/000000000000217685/X-VIVO-15-Serum-free-Hematopoietic-Cell-Medium

18. この後の試験測定では（第 2、3 および 4 回）、X-VIVO™ 15 ストック溶液を、最初の実験での細胞生存率 0.5 濃度（CV05；Inh-GAPLA が 0.05 未満になる最低濃度）の 4 倍の濃度になるよう作成する。第 1 回測定の最高濃度で、Inh-GAPLA が 0.05 を下回るほど小さくない場合、X-VIVO™ 15 ストック溶液を、最初の測定の最高濃度で作成する。最初の測定のストック溶液濃度を CV05 (X) 希釀倍率 (CV05 (X) 希釀倍率；ストック溶液を希釀して CV05 にするのに必要な希釀倍率) で割って、CV05 の濃度を算出する（補遺 V 参照）。20 mg/mL で X-VIVO に不溶性の被験物質の場合、ストック溶液濃度 × 1/X として CV05 を求める。第 2~4 回測定の場合、次のストック溶液を 4 × CV50 として調製する（補遺 V）。

19. X-VIVO™ 15 の第 2 のストック溶液の希釀系列を、希釀倍率 1.5 で、96 ウェルプレートを用いて作成する。次に、50 µL/ウェルの希釀溶液を、96 ウェル平底黒色プレートに入った 50 µL 細胞懸濁液に加える。各被験化学物質の濃度ごとに 4 ウェルを試験する。次に、試料をプレートシェーカーで混和し、37°C、5% CO₂ で 16 時間インキュベートしたのち、ルシフェラーゼ活性を下記の通りに測定する。

20. 溶媒対照は、50 µL/ウェルの X-VIVO™ 15 と、10%FBS 含有 RPMI-1640 を用いた 50 µL/ウェル 細胞懸濁液との混合物である。

21. 推奨される陽性対照は 4-NBB である。20 mg の 4-NBB を、1.5 mL 用マイクロ遠心チューブに入れ、X-VIVO™ 15 を 1 mL になるまで加える。4-NBB は X-VIVO™ 15 に 20 mg/mL では完全には溶解しないため（段落 16 を参照）、このマイクロ遠心チューブを vortex ミキサーにかけたあと、最高 8 rpm のスピードのロータを用いて 30 分以上振盪する。20,000 g で 5 分間遠心分離したあと、上清を X-VIVO™ 15 を用いて 4 倍に希釀し、希釀上清 500 µL を 96 ウェルプレートのウェルのひとつに入れる。この希釀溶液を、X-VIVO™ 15 を用いてさらに 2 倍および 4 倍に希釀する。この溶液 50 µL を、96 ウェル平底黒色プレートのウェルに入った 50 µL の THP-G8 細胞懸濁液に加える（補遺 VI）。各濃度の陽性対照を 4 ウェルで検討する。プレートをプレートシェーカーで振盪し、CO₂ インキュベータで 16 時間インキュベートしたのち（37°C、5% CO₂）、ルシフェラーゼ活性を段落 28 の記載の通りに測定する。

22. 推奨される陰性対照は乳酸である。20 mg の乳酸を、1.5 mL 用マイクロ遠心チューブに入れ、X-VIVO™ 15 を 1 mL になるまで加える（20 mg/mL）。20 mg/mL の乳酸溶液を X-VIVO™ 15 を用いて 5 倍に希釀し（4 mg/mL）；この 4 mg/mL 乳酸溶液 500 µL を 96 ウェルプレートのウェルのひとつに入れる。この溶液を、X-VIVO™ 15 で 2 倍に希釀し、さらに 2 倍に希釀して、2 mg/mL 溶液および 1 mg/mL 溶液を作成する。この 3 つの溶液 50 µL と溶媒対照（X-VIVO™ 15）を、96 ウェル平底黒色プレートのウェルに入った 50 µL の THP-G8 細胞懸濁液に加える。各濃度の陰性対照を 4 ウェルで検討する。プレートをプレートシェーカーで振盪し、CO₂ インキュベータで 16 時間インキュベートしたのち（37°C、5% CO₂）、ルシフェラーゼ活性を段落 28 の記載の通りに測定する。

23. 背景データがあり、ほぼ同じ実施許容基準を満たせば、これ以外の適切な陽性対照または陰性対照を用いることができる。

24. 被験化学物質とのインキュベーションに先立ち、例えば、プレートをシールすることにより、揮発性の被験化学物質の蒸発、および被験化学物質によるウェル間の交差汚染を回避する。

25. 陽性または陰性の結果を得るのに、被験化学物質および溶媒対照を 2~4 回測定する必要がある（表 2 参照）。各測定は別の日に実施し、新鮮な被験化学物質 X-VIVO™ 15 ストック溶液と、独立に採取した細胞を用いる。細胞は同じ継代数由来でもよい。

ルシフェラーゼ活性の測定

26. 光学フィルター付き 96 ウェルマイクロプレート用ルミノメータを用いて、発光を測定する。このようなものに、Phelios (ATTO、東京)、Tristan 941 (Berthold、ドイツ、パート・ヴィルトバート) や ARVO series (PerkinElmer、米国マサチューセッツ州ウォルサム) がある。再現性を確保するため、ルミノメータは試験ごとに校正する必要がある。橙色および赤色を発光する遺伝子組換えルシフェラーゼを校正に使用する。

27. 事前に温めた Tripluc®ルシフェラーゼアッセイ試薬 (Tripluc) 100 µL を、化学物質あり、またはなしで処理した細胞懸濁液が入ったそれぞれのウェルに入れる。プレートを約 20°C の周囲温度で 10 分間振盪する。プレートをルミノメータに置いて、ルシフェラーゼ活性を測定する。生物発光を、光学フィルターなし (F0) およびあり (F1) で、それぞれ 3 秒間測定する。使用するルミノメータのモデルに応じて別の設定を用いる場合には、その妥当性を示す必要がある。

28. 各濃度でのパラメータを、測定値から求める。これは具体的には、IL8LA、GAPLA、nIL8LA、Ind-IL8LA、Inh-GAPLA、IL8LA の平均 ± SD、GAPLA の平均 ± SD、nIL8LA の平均 ± SD、Ind-IL8LA の平均 ± SD、Inh-GAPLA の平均 ± SD、Ind-IL8LA の 95% 信頼区間である。この段落に使用したパラメータの定義を、補遺 I および IV に記載する。

29. 測定に先立って、マルチカラーレポーターアッセイにおける色識別は一般に、シャープカット (ロングパスまたはショートパス) フィルターまたはバンドパスフィルターなどの光学フィルターを備えた検出器 (ルミノメータおよびプレートリーダ) で行う。各生物発光シグナルカラー用フィルターの透過係数を、補遺 II に基づいて試験前に校正する。

データおよび報告

データの評価

30. IL-8 Luc アッセイの各測定における陽性／陰性判定の基準は以下の通り：

- 被験化学物質の Ind-IL8LA > 1.4 で、Ind-IL8LA の 95% 信頼区間の下限 < 1.0 である場合に、IL-8 Luc アッセイ結果を陽性と判定する
- 被験化学物質の Ind-IL8LA < 1.4 および／または Ind-IL8LA の 95% 信頼区間の下限 < 1.0 である場合に、IL-8 Luc アッセイ結果を陰性と判定する

予測モデル

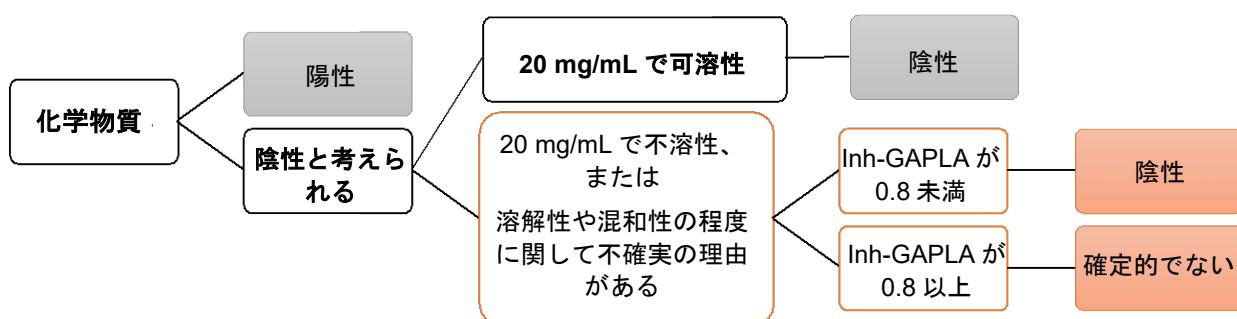
31. 第 1 回、第 2 回、第 3 回および第 4 回の測定のうち、陽性結果を 2 回認めた被験化学物質を陽性

と判断し、第1回、第2回、第3回および第4回の測定のうち、陰性結果を3回認めた被験化学物質を陰性と考えられると判断する（表2）。陰性と考えられる被験化学物質のうち、X-VIVO™ 15に20 mg/mLで溶解するものを陰性と判定する。被験化学物質がX-VIVO™ 15に20 mg/mLで溶解しないか、溶解性や混和性の程度に関して不確実の理由がある場合、Inh-GAPLAが0.8未満の被験化学物質を陰性と判断する。ただし、Inh-GAPLAが0.8以上の場合は確定的でないと判断する（図1）。

表2.陽性ないし陰性と考えられると特定する基準

第1回測定	第2回測定	第3回測定	第4回測定	判断
陽性	陽性	-	-	陽性
陽性	陰性	陽性	-	陽性
陽性	陰性	陰性	陽性	陽性
陽性	陰性	陰性	陰性	陰性と考えられる
陰性	陽性	陽性	-	陽性
陰性	陽性	陰性	陽性	陽性
陰性	陽性	陰性	陰性	陰性と考えられる
陰性	陰性	陽性	陽性	陽性
陰性	陰性	陽性	陰性	陰性と考えられる
陰性	陰性	陰性	-	陰性と考えられる

図1.最終判断のための予測モデル



許容基準

32. IL-8 Luc アッセイを用いる場合、次の許容基準を満たすこと：

- 各測定で、陽性対照である 4-NBB のひとつ以上の濃度で Ind-IL8LA が 5.0 を上回る必要がある。
- 各測定で、陰性対照である乳酸のいずれかの濃度で Ind-IL8LA が 1.4 を下回る必要がある。
- 細胞と Tripluc が入っているが化学物質が入っていない対照ウェルの GAPLA が、試験培地と Tripluc のみが入っているウェルの GAPLA の 5 倍を下回る場合、このプレートのデータを用いてはならない。
- どの濃度の被験化学物質も Inh-GAPLA が 0.05 を下回る場合、このプレートのデータを用いてはならない。このような場合、最初の試験を再度実施して、再試験の最高最終濃度が前の試験の最低最終濃度になるようにする。

試験報告書

33. 試験報告書には以下の情報を含める。

被験化学物質

- 単一成分物質 :

- 化学的識別情報、例えば IUPAC 名または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはそれ以外の識別に有用な情報
- 外観、水への溶解度、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質
- 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、試験前の処理（例えば、加温、粉碎）
- X-VIVO™ 15 への溶解度 X-VIVO™ 15 に不溶性の化学物質の場合、遠心分離によって沈殿物ないし浮遊物を認めるかどうか
- 試験濃度
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性
- X-VIVO™ 15 を使用していない場合、各被験化学物質に対する溶媒／媒体選択の妥当性。

- 多成分物質、UVCB 物質および混合物 :

- 入手可能な範囲の成分の化学的識別情報（上記参照）、純度、含有量および関連のある物理化学的性質（上記参照）などによるできる限りの成分の特性
- 外観、水への溶解度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質
- 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、試験前の処理（例えば、加温、粉碎）
- X-VIVO™ 15への溶解度 X-VIVO™ 15に不溶性の化学物質の場合、遠心分離によって沈殿物ないし浮遊物を認めるかどうか
- 試験濃度
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性
- X-VIVO™ 15を使用していない場合、各被験化学物質に対する溶媒／媒体選択の妥当性。

対照

- 陽性対照：
 - 化学的識別情報、例えば IUPAC 名または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはそれ以外の識別に有用な情報
 - 外観、水への溶解度、分子量および入手可能な範囲で該当する場合、その他の関連する物理化学的性質
 - 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、試験前の処理（例えば、加温、粉碎）
 - 試験濃度
 - 入手可能な範囲の保存条件および安定性
 - 該当する場合、適切な許容基準であることを示す陽性対照結果の背景データ
- 陰性対照：
 - 化学的識別情報、例えば IUPAC 名または CAS 名、CAS 番号および／またはそれ以外の識別に有用な情報
 - 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
 - 本試験法ガイドラインに記載以外の別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質
 - 入手可能な範囲の保存条件および安定性
 - 各被験化学物質についての溶媒選択の妥当性。

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住所
- 試験法の説明
- 細胞株、その保存条件および供給元（細胞株を入手した施設など）
- FBCのロット番号および入手先、供給業者名称、96 ウェル平底黒色プレートのロット番号、Tripluc試薬のロット番号

- 繼代数および試験に用いた細胞密度
- 試験前の播種に用いた細胞計数法と、均一な細胞数を確保するための措置
- 使用したルミノメータ（モデル）に関する機器設定、使用したルシフェラーゼ基質、補遺 II に記載されている対照試験に基づく適切な発光測定法の実証
- 本試験法実施における実施施設の習熟度を示し（例えば、習熟度評価用物質の検討により）、経時的な再現性を立証するのに用いた手順

試験手順

- 反復数および測定回数
- 被験化学物質濃度、適用手順および曝露時間（推奨と異なる場合）
- 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

- IL8LA および GAPLA の測定値
- nIL8LA、Ind-IL8LA および Inh-GAPLA の算出値
- Ind-IL8LA の 95% 信頼区間
- ルシフェラーゼ活性誘導倍率および細胞生存率の用量反応曲線のグラフ
- 該当する場合、それ以外に関連する知見があればその記述

結果の考察

- IL-8 Luc アッセイを用いて得た結果の考察
- 他の関連情報が入手可能な場合、IATA の範囲内における試験結果の考察

結論

参考文献

1. Toebak, M.J., Pohlmann, P.R., Sampat-Sardjoepersad, S.C., von Blomberg, B.M., Bruynzeel, D.P., Schepers, R.J., Rustemeyer, T., Gibbs, S. (2006), CXCL8 secretion by dendritic cells predicts contact allergens from irritants. *Toxicol In Vitro* 20, 117-124, 10.1016/j.tiv.2005.06.039
2. Takahashi, T., Kimura, Y., Saito, R., et al. (2011), An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 124: 359-369, 10.1093/toxsci/kfr237
3. Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., et al. (2015), Optimization of the IL-8 Luc assay as an in vitro test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29: 1816-1830, 10.1016/j.tiv.2015.07.006
4. Kimura, Y., Watanabe, M., Suzuki, N., et al. (2018), The performance of an in vitro skin sensitisation test, IL-8 Luc assay (OECD442E), and the integrated approach with direct peptide reactive assay (DPRA). *J Toxicol Sci* 43: 741-749, 10.2131/jts.43.741
5. OECD (2023), Draft – Second edition of the Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No. 267. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
6. OECD (2017), Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for in vitro skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No. 258, [ENV/JM/MONO\(2017\)20](#). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
7. Urbsch, D., Mehling, A., Guth, K., et al. (2015), Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71: 337-351, 10.1016/j.yrtph.2014.12.008
8. Kimura, Y., Fujimura, C., Aiba, S. (2021), The modified IL-8 Luc assay, an in vitro skin sensitisation test, can significantly improve the false-negative judgment of lipophilic sensitizers with logKow values > 3.5. *Arch Toxicol* 95: 749-758, 10.1007/s00204-020-02934-9
9. Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., et al. (2010), A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 38: 275-284
10. Patlewicz, G., Casati, S., Basketter, D.A., et al. (2016), Can currently available non-animal methods detect pre and pro-haptens relevant for skin sensitization? *Regul Toxicol Pharmacol* 82: 147-155, 10.1016/j.yrtph.2016.08.007
11. Thorne, N., Inglese, J., Auld, D.S. (2010), Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chem Biol* 17: 646-657, 10.1016/j.chembiol.2010.05.012
12. OECD (2016), Test No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
13. Viviani, V., Uchida, A., Suenaga, N., et al. (2001), Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 1286-1291, 10.1006/bbrc.2001.4254

14. Viviani, V.R., Bechara, E.J., Ohmiya, Y. (1999), Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry* 38: 8271-8279, 10.1021/bi9900830
15. Nakajima, Y., Kimura, T., Sugata, K., et al. (2005), Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. *Biotechniques* 38: 891-894, 05386ST03 [pii]
16. Edwards, D.R., Denhardt, D.T. (1985), A study of mitochondrial and nuclear transcription with cloned cDNA probes. Changes in the relative abundance of mitochondrial transcripts after stimulation of quiescent mouse fibroblasts. *Exp Cell Res* 157: 127-143,
17. Mori, R., Wang, Q., Danenberg, K.D., et al. (2008), Both beta-actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *Prostate* 68: 1555-1560, 10.1002/pros.20815
18. Winer, J., Jung, C.K., Shackel, I., et al. (1999), Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* 270: 41-49, 10.1006/abio.1999.4085
19. OECD (2018), Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP), OECD Series on Testing and Assessment, No. 286, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264304796-en>
20. United Nations (2015), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978- 92-1-117006-1. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/rev05/05files_e.html.

補遺 I :用語の定義

正確度：試験法による結果と、一般的に認められた参考値との近さ。試験法の性能の尺度であり、妥当性の一側面である。この用語は、多くの場合、試験法の正確な結果の割合を意味する一致性和同義的に用いられる。

AOP（有害性発現経路）：分子レベルのイニシャルイベントから検討対象の *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。

CV05：Cell viability 05 の略語。Inh-GAPLA が 0.05 未満となる化学物質の最低濃度。

FInSLO-LA：IL-8 Luc アッセイに関するバリデーション報告およびこれまでの発表に用いられている Ind-IL8LA を示す略語。定義については Ind-IL8LA を参照のこと。

GAPLA：GAPDH プロモータによって制御される Stable Luciferase Red (SLR) ($\lambda_{max} = 630\text{ nm}$) のルシフェラーゼ活性で、細胞生存率および生細胞数を示す。

有害性：生物、系統、または（亜）集団がある物質に曝露された場合、悪影響を引き起こす可能性がある物質固有の性質または状態のこと。

IATA（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有害性の識別（可能性）、有害性の特徴付け（強度）および／または安全性評価（可能性／強度および曝露）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、有害性の可能性、リスクや、さらに目的を絞った最小限となる試験の必要性について、規制上の意思決定情報を与える。

II-SLR-LA：IL-8 Luc アッセイに関するバリデーション報告およびこれまでの発表に用いられている Inh-GAPLA を示す略語。定義については Inh-GAPLA を参照のこと。

IL-8（インターロイキン-8）：内皮細胞、線維芽細胞、角化細胞、マクロファージおよび単球が產生するサイトカインのひとつで、好中球およびTリンパ球に走化性を生じる。

IL8LA：IL-8 プロモータによって制御される Stable Luciferase Orange (SLO) ($\lambda_{max} = 580\text{ nm}$) のルシフェラーゼ活性。

Ind-IL8LA：IL8LA の誘導倍率。化学物質で処理した THP-G8 細胞の nIL8LA を、無刺激 THP-G8 細胞の nIL8LA で割ったものであり、化学物質による IL-8 プロモータ活性誘導倍率を表す。

Inh-GAPLA：GAPLA の阻害値。化学物質で処理した THP-G8 細胞の GAPLA を、無刺激 THP-G8 細胞の GAPLA で割ったものであり、化学物質による細胞毒性を表す。

最小誘導閾値（MIT）：化学物質が陽性基準を満たす最低濃度

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。

单一成分物質：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) 以上および 80% (w/w) 未満で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されることにある。

nIL8LA：IL-8 プロモータ活性 (IL8LA) を反映する SLO ルシフェラーゼ活性を、GAPDH プロモータ活性 (GALPA) を反映する SLR ルシフェラーゼ活性で正規化したもの。細胞生存率や細胞数を考慮したあとの IL-8 プロモータ活性を表す。

nSLO-LA：IL-8 Luc アッセイに関するバリデーション報告およびこれまでの発表に用いられている nIL8LA を示す略語。定義については nIL8LA を参照のこと。

陽性対照：試験系のすべての構成成分を含み、陽性反応を誘導することが知られている物質を用いて実施する試験部分。陽性対照反応の経時的变化を評価できるように、陽性反応の大きさが過剰であってはならない。

プレハプテン：非生物変換を通じて感作性物質となる化学物質。

プロハプテン：皮膚感作性を生じるために、酵素による活性化を要する化学物質。

ヨウ化プロピジウム (PI) 排除細胞：蛍光マーカーであるヨウ化プロピジウム (PI) は生細胞に取り込まれない。従って、蛍光染色およびフローサイトメトリーでは、PI で染色されていない細胞を生細胞、染色されている細胞を死細胞とみなす。

妥当性：試験と検討対象の影響との関係と、試験が特定の目的にとって意義や有用性があるかを示す用語。試験が試験対象となる生物学的影響を正確に測定または予測できる程度を示す。妥当性は、試験法の正確性（一致度）も考慮する。

信頼性：同じプロトコルを用いて試験法を実施したとき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。施設内再現性および施設間再現性ならびに施設内の繰り返し精度の算出により評価される。

測定：溶媒／媒体対照および陽性対照とともに同時に検討される1つ以上の被験化学物質からなる一組の試験。

感度：すべての陽性化学物質や活性化学物質のうち、試験によって正確に分類されるものの割合。分類的な結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で考慮することが重要である。

SLO-LA：IL-8 Luc アッセイに関するバリデーション報告およびこれまでの発表に用いられている IL8LA を示す略語。定義については IL8LA を参照のこと。

SLR-LA：IL-8 Luc アッセイに関するバリデーション報告およびこれまでの発表に用いられている GAPLA を示す略語。定義については GAPLA を参照のこと。

溶媒／媒体対照：用いる溶媒／媒体などの試験系のすべての構成成分を含むが、被験化学

物質を含まない未処理試料のこと。同じ溶媒／媒体に溶解、または安定的に分散した被験化学物質で処理した試料について、ベースラインの反応を確認するために用いられる。培地対照を同時に用いた試験の場合、本試料は、溶媒／媒体と試験系との相互作用の有無も示す。

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。分類的な結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で考慮することが重要である。

物質：自然の状態または製造過程で得られる化学元素とその化合物のことをいい、その製品の安定性を保つために必要な添加物や、その使用工程から派生する不純物は含まれるが、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する可能性のある溶媒は除く。

界面活性剤：表面活性剤とも呼ばれる物質で、洗剤などを含む。液体の表面張力を低下させることにより、泡を生じさせたり、固体に浸透することができる。浸潤剤とも呼ばれる。
(TG437)

被験化学物質：「被験化学物質」という用語は、試験対象であることをいう場合に用いる。

THP-G8：IL-8 Luc アッセイに用いられる IL-8 レポーター細胞株。IL-8 プロモータおよび GAPDH プロモータの制御を受けるように SLO および SLR のルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだヒトマクロファージ様細胞株 THP-1。

国際連合の化学物質の分類および表示に関する世界調和システム (UN GHS)：人々（雇用主、労働者、輸送担当者、消費者、緊急時対応者など）および環境を守るために、有害作用に関する情報を伝達することを目的として、物理学上、健康上および環境上の有害性の種類およびレベルの基準に従って化学物質（物質および混合物）の分類法を提案するとともに、ピクトグラム・注意喚起語・有害性情報・注意書き・化学物質安全性データシートなどの対応する伝達要素を取り扱うシステムである。

UVCB：組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生体物質。

妥当な試験法：特定の目的に対し十分な妥当性および信頼性があるとみなされ、科学的に健全な原則に基づいている試験法。ある試験法が絶対的な意味で妥当というのではなく、定義された目的との関連においてのみ妥当であることをいう。

補遺Ⅱ:ルシフェラーゼ活性測定の原理と SLO および SLR 用光学フィルターの透過係数の決定

マルチレポーター・アッセイ・システムである Tripluc を、光学フィルターを装着しうるマルチカラーチャンネル検出システムを備えたマイクロプレートタイプのルミノメータ（例えば、Phelios AB-2350 (ATTO) 、ARVO (PerkinElmer) 、Tristar LB941 (Berthold) ）で使用することができる。測定に用いる光学フィルターは、600~620 nm のロングパスないしショートパスフィルターまたは 600~700 nm のバンドパスフィルターである。

(1) 1枚の光学フィルターを用いた2色のルシフェラーゼ測定。

これは、Phelios AB-2350 (ATTO) を使用した場合である。このルミノメータは、SLO ($\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$) と SLR ($\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$) との発光を分離するため、600 nm ロングパスフィルター (R60 HOYA Co.、600 nm LP、フィルター1) を備えている。

まず、600 nm LP の透過係数を求めるため、精製 SLO および SLR ルシフェラーゼ酵素を用いて、i) フィルターなしでの SLO および SLR の生物発光強度 (F_0) と、ii) 600 nm LP (フィルター1) を透過した SLO および SLR の生物発光強度とを測定し、iii) 以下に挙げる SLO および SLR の 600 nm LP 透過係数を算出する。

透過係数		略語	定義
SLO	フィルター1 透過係数	κO_{R60}	SLO のフィルター透過係数
SLR	フィルター1 透過係数	κR_{R60}	SLR のフィルター透過係数

試験試料の SLO および SLR の強度をそれぞれ O および R と定義した場合、i) フィルターなしでの光の強度 (全光) F_0 、ii) 600 nm LP (フィルター1) を透過した光の強度 F_1 を次の通りに表すことができる。

$$F_0 = O + R$$

$$F_1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$$

ここに挙げた式を、次のように書き換えることができる：

$$\begin{pmatrix} F_0 \\ F_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

ここで、算出した透過係数 (κO_{R60} および κR_{R60}) 、 F_0 および F_1 を用いて、 O および R の値を次の通りに算出することができる：

$$\begin{pmatrix} 0 \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

透過係数を求めるための材料と方法

(1) 試薬

- ・ 単一精製ルシフェラーゼ酵素 :

凍結乾燥精製 SLO 酵素

凍結乾燥精製 SLR 酵素

(バリデーション操作作用に、Tottori Bioscience Promotion Organization、鳥取県から THP-G8 細胞株とともに入手した)

- ・ アッセイ試薬 :

Tripluc®ルシフェラーゼアッセイ試薬 (TOYOBO Cat# MRA-301 など)

- ・ 培地 : ルシフェラーゼアッセイ用 (30 mL、2~8°C で保管)

試薬	濃度	培地中最終濃度	必要量
RPMI-1640	-	-	27 mL
FBS	-	10 %	3 mL

(2) 酵素液の調製

チューブに入った凍結乾燥精製ルシフェラーゼ酵素に、10% (w/v) グリセロールを添加した 200 μL の 10~100 mM Tris/HCl または Hepes/HCl (pH 7.5~8.0) を加えて溶解し、この酵素液を、1.5 mL ディスポーザブルチューブに 10 μL ずつ分取し、-80°C の冷凍庫に保管する。凍結酵素液は、最長 6 カ月まで使用可能である。使用する際には、酵素液の入ったチューブ (希釀酵素液) それぞれに、1 mL のルシフェラーゼアッセイ用培地 (10% FBS 含有 RPMI-1640) を加え、失活しないように氷上に置く。

(3) 生物発光測定

Tripluc®ルシフェラーゼアッセイ試薬 (Tripluc) を融解し、ウォーターバスに入れるか静置により室温に保つ。測定開始 30 分前にルミノメータの電源を入れ、光電子増倍管を安定化させる。希釀酵素液 100 μL を、96 ウエル黒色プレート (平底) に移す (SLO 参照試料#B1、#B2、#B3 および SLR 参照試料 #D1、#D2、#D3)。次に、この希釀酵素液を入れたプレートの各ウェルに、予め加温した Tripluc 100 μL をピペットマンを用いて加える。プレートシェーカーを用いて、このプレートを室温 (約 25°C) で 10 分間振盪する。ウェルの溶液に気泡があれば、これを除去する。ルシフェラーゼ活性を測定するため、プレートをルミノメータに置く。生物発光を、光学フィルターなし (F0) およびあり (F1) で、それぞれ 3 秒間測定する。

次の通りに、光学フィルターの透過係数を算出した。

$$\text{透過係数 (SLO}(\kappa O_{R60})) = (F1 \text{ の} \#B1 + F1 \text{ の} \#B2 + F1 \text{ の} \#B3) / (F0 \text{ の} \#B1 + F0 \text{ の} \#B2 + F0 \text{ の} \#B3)$$

透過係数 ($SLR(kR_{R60})$) = $(F1 \text{ の } #D1 + F1 \text{ の } #D2 + F1 \text{ の } #D3) / (F0 \text{ の } #D1 + F0 \text{ の } #D2 + F0 \text{ の } #B3)$

同じルミノメータを用いて実施した測定値すべてに、算出した透過率を用いる。

装置の品質管理

IL-8 Luc プロトコルに記載の手順を用いる (5)

補遺Ⅲ：習熟度評価用の物質

本試験法ガイドライン 442E の付属書に従って試験法を日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、表 1 で推奨される 9 物質について、IL-8 Luc アッセイにより期待される予測結果を入手し、(皮膚感作性の有害性に関する反応の範囲を表すように選択した) 習熟度確認 9 物質中 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確認することにより技術的習熟度を立証すること。それ以外の選択基準は、その物質が市販品であること、高品質の *in vivo* 参照データが入手可能であること、および IL-8 Luc アッセイにより得られた高品質の *in vitro* データが入手可能であることに基づく。公表されている参照データが IL-8 Luc アッセイで利用可能であることを含む (6) (1)。

表 1 : IL-8 Luc アッセイの習熟度確認の立証に推奨される物質

習熟度評価用の物質	CAS 番号	状態	20 mg/mL での X-VIVO15 溶解性	<i>In vivo</i> における 予測 ¹	IL-8 Luc による 予測 ²	基準範囲 (μg/mL) ³	
						CV05 ⁴	IL-8 Luc MIT ⁵
2,4-ジニトロクロロベンゼン	97-00-7	固体	不溶性 ⁶	感作性物質 (非常に強い)	陽性	2.3-3.9	0.5-2.3
ホルムアルデヒド	50-00-0	液体	可溶性	感作性物質 (強い)	陽性	9-30	4-9
2-メルカプトベンゾチアゾール	149-30-4	固体	不溶性 ⁶	感作性物質 (中等度)	陽性	250-290	60-250
エチレンジアミン	107-15-3	液体	可溶性	感作性物質 (中等度)	陽性	500-700	0.1-0.4
エチレングリコールジメチルアクリレート	97-90-5	液体	不溶性 ⁶	感作性物質 (弱い)	陽性	>2000	0.04-0.1
シトラール	5392-40-5	液体	不溶性 ⁶	感作性物質 (弱い)	陽性	12-30	4-12
ストレプトマイシン硫酸塩	3810-74-0	固体	可溶性	非感作性物質	陰性	>2000	>2000
グリセロール	56-81-5	液体	可溶性	非感作性物質	陰性	>2000	>2000
イソプロパノール	67-63-0	液体	可溶性	非感作性物質	陰性	>2000	>2000

略語 : CAS 番号=Chemical Abstracts Service Registry Number

¹ *In vivo* における強度は、ECETOC により提唱された基準を用いている (20)。

² 既存の測定値に基づく (2) (9)。

³ EPI Suite™で得た水に対する溶解度を用いて、CV05 および IL-8 Luc MIT を算出した。

⁴ CV05 : Inh-GAPLA が 0.05 未満となる化学物質の最低濃度。⁵ MIT 化学物質が陽性基準を満たす最低濃度。

⁶ 不溶性または完全に溶解しない

補遺IV:指標および判断基準

nIL8LA (nSLO-LA)

IL8LA (SLO-LA) および GAPLA (SLR-LA) についてそれぞれ、i 番目の濃度 ($i = 0 \sim 11$) の j 番目の繰り返し ($j = 1 \sim 4$) 測定を実施する。正規化 IL8LA を nIL8LA (nSLO-LA) と呼び、次の式で表される：

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij} / GAPLA_{ij}$$

これが、このアッセイにおける基本の測定値である。

Ind-IL8LA (FlnSLO-LA)

i 番目の濃度での繰り返しに関して、nIL8LA (nSLO-LA) 平均値を、この濃度が 0 のものと比較した倍数。Ind-IL8LA がこのアッセイの最重要尺度である。この比は次の式で表される：

$$Ind-IL8LA_i = \left\langle (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij} \right\rangle / \left\langle (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j} \right\rangle.$$

主導試験室は、値 1.4 が被験化学物質の陽性結果に相当することを提案している。この値は、主導試験室の背景データの検討に基づいている。その後、データマネジメントチームがどのバリデーション試験フェーズにもこの値を使用している。主要評価項目である Ind-IL8LA は、式に示す通り、2 つの算術平均の比である。

95%信頼区間 (95% CI)

上記の比の 95%信頼区間 (95% CI) は、主要評価項目の精度を示すと考えられる。95% CI の下限が 1 以上であれば、i 番目の濃度の nIL8LA が、溶媒対照より有意に高いことを示している。95% CI を求めるにはいくつかの方法がある。本試験では、Fieller の定理として知られている方法を用いた。この 95%信頼区間は次の式で求められる：

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \right],$$

ここで $A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$, $B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$, $C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{y_i}^2}{n_{y_i}}$, $n_0 = 4$,

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j n_{IL8LA_{0j}}, sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (n_{IL8LA_{0j}} - \bar{x}_0)^2,$$

$$n_{y_i} = 4, \bar{y}_i = (1/n_{y_i}) \times \sum_j (n_{IL8LA_{ij}}), sd_{y_i}^2 = \{1/(n_{y_i} - 1)\} \times \sum_j (n_{IL8LA_{ij}} - \bar{y}_i)^2.$$

$t_{0.975(v)}$ は、自由度 v での中央 t 分布の 97.5 パーセンタイルであり、ここで、

$$v = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{y_i}^2}{n_{y_i}} \right)^2 / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{y_i}^2}{n_{y_i}} \right)^2 / (n_{y_i} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

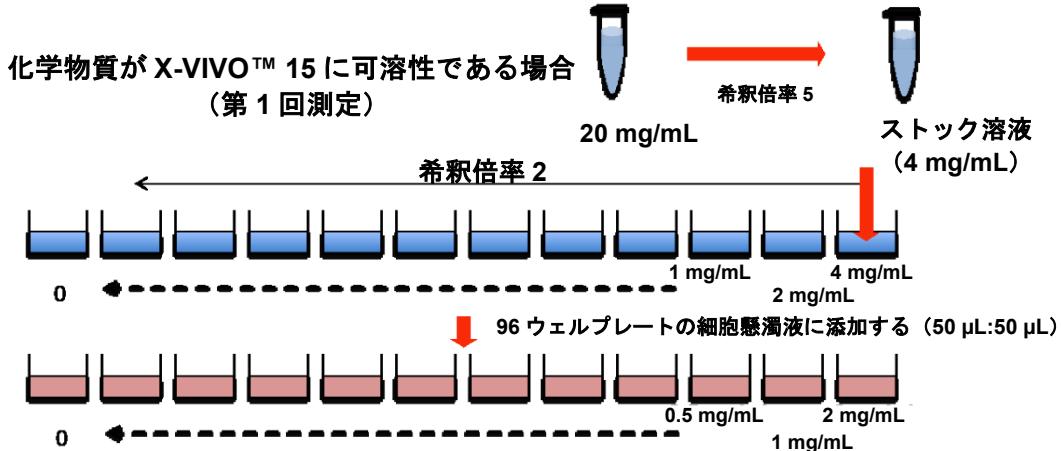
Inh-GAPLA は、 i 番目の濃度での繰り返しに関して、GAPLA (SLR-LA) 平均値を溶媒対照と比較した比率であり、次のように表される：

$$Inh-GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

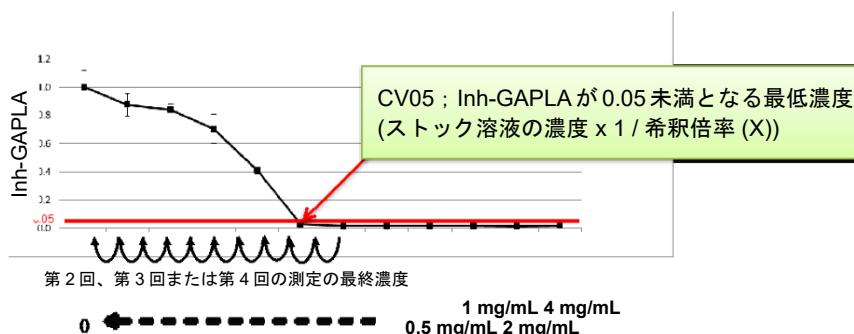
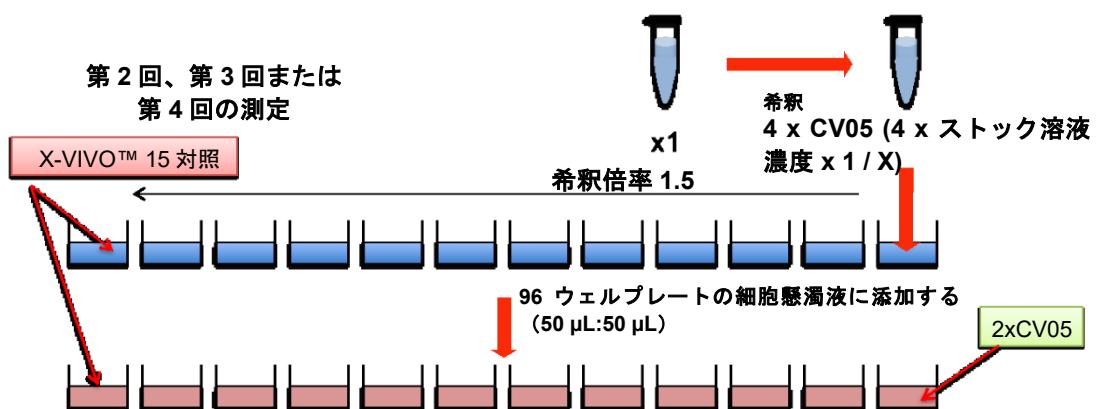
GAPLA は n_{IL8LA} の分母であることから、極端に小さい値であると n_{IL8LA} のばらつきが大きくなる。従って、Inh-GAPLA が極端に小さい値（0.05 未満）である Ind-IL8LA 値は、精度が低いと考えられる。

補遺V:IL-8 LUC アッセイ用に化学物質を溶解する方法

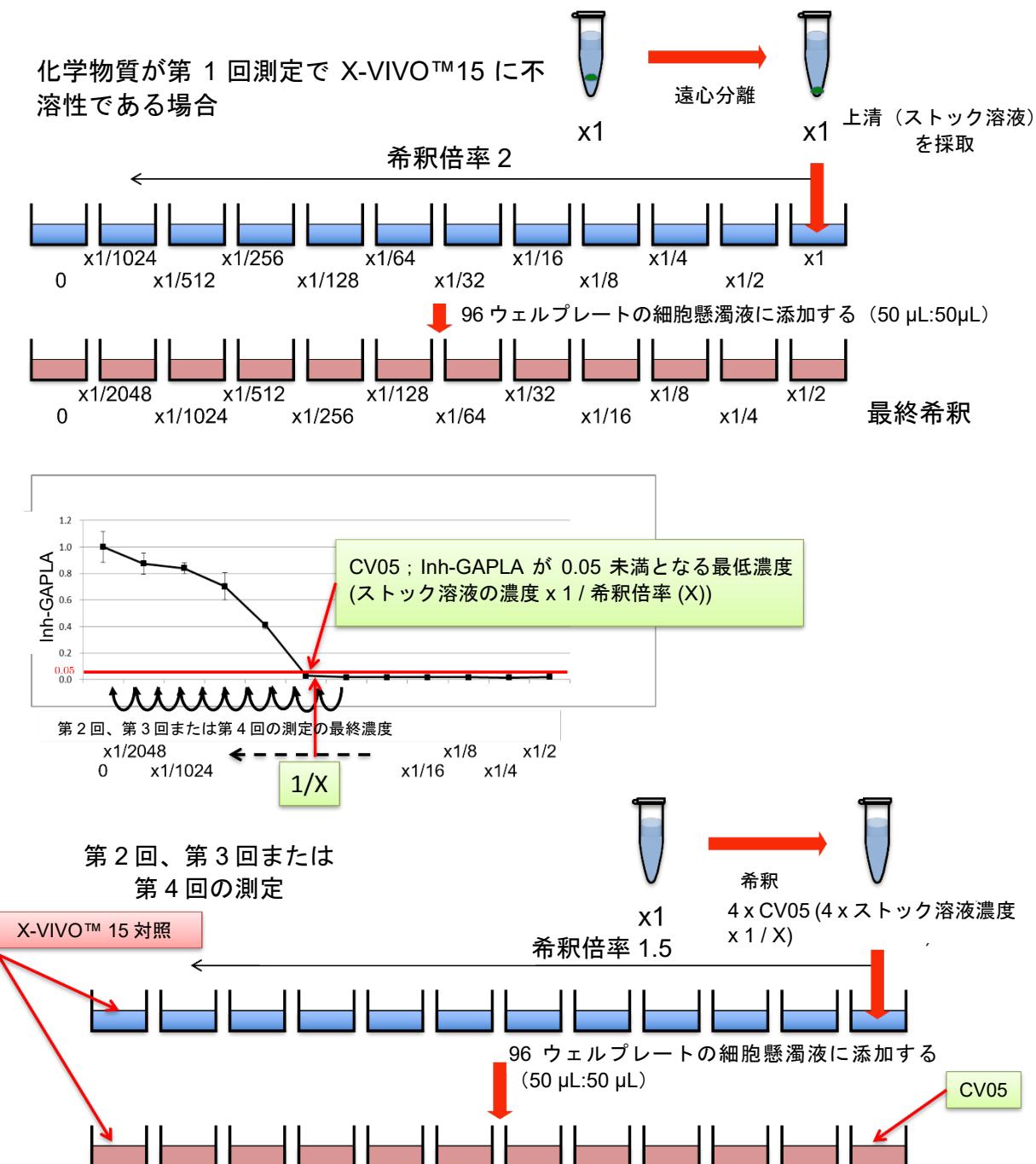
a) 化学物質が 20 mg/mL で X-VIVO™ 15 に溶解する場合



下記の実験の最高濃度を求める

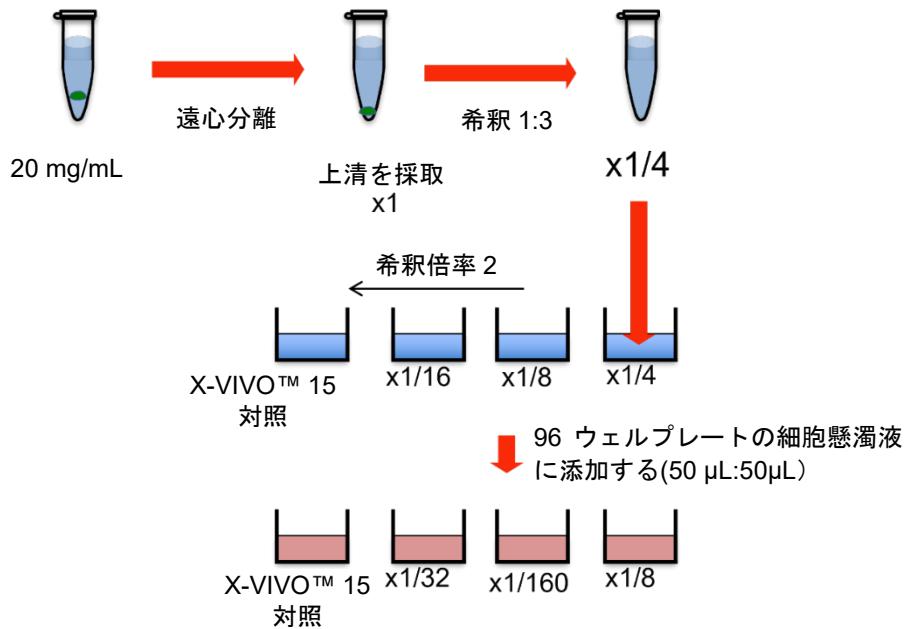
第 2 回、第 3 回または
第 4 回の測定

b) 化学物質が 20 mg/mL で X-VIVO™ 15 に不溶性である場合



補遺VI:IL-8 Luc アッセイの陽性対照用に 4-NBB を溶解する方法

陽性対照 : 4-NBB (X-VIVO™ 15 に完全には溶解しない)



付属書 4 : *In Vitro* 皮膚感作性 : 皮膚感作性の評価 (GARD™skin) に関するゲノムアレルゲン迅速検出 (GARD™)

最初に考慮すべき事項および限界

1. GARD™skin 法は、皮膚感作性物質に関する有害性の有無（すなわち、UN GHS 区分 1 か非感作性物質か）を識別する。この方法は、骨髓性白血病細胞株 MUTZ-3 (3) (4) (5) のサブクローンである SenzaCell™ 細胞株 (1) (2) を被験化学物質に曝露させ、GARDskin ゲノム予測シグネチャ (GPS) と呼ばれるエンドポイント特異的ゲノムバイオマーカーシグネチャの転写パターンを評価する。
2. 十分に特性が明らかにされている一群の皮膚感作性物質 (UN GHS 区分 1) (N=20) および非感作性物質 (N=20) に代替ヒト DC 様 SenzaCell 細胞株を曝露させて、ディスカバリーデータセットのゲノムワイドデータ駆動型解析により、GARDskin GPS (196 遺伝子) を特定した (6)。OECD AOP の KE3 に記載されているように、GPS は、生体異物認識、免疫学的危険信号の発生、DC 活性化に関連するメカニズムイベントをモニタリングすることができる。なお、GARDskin GPS に関連するメカニズムイベントによっては、DC 細胞株でモニタリングされる他の KE と関連している可能性もある。GPS の起源および生物学的機能に関する詳細については、GARDskin 試験法の試験ガイドラインの補足文書 (Supporting document to the Test Guideline for the GARDskin test method) (7) を参照のこと。予測アッセイにおける GARDskin GPS の利用が提案され (8)、GeneChip ®マイクロアレイプラットフォームに基づく GARDskin アプリケーションで機能性が実証された (9)。標的遺伝子発現解析 (10) に関する代替技術プラットフォームを評価したのち、GARDskin を NanoString nCounter®システム (11) フォーマットに移行させたところ、予測性能の保持およびリソース有効性の改善を示すことが立証された (12)。
3. GARDskin 法は、SenzaGen AB が主導したバリデーション試験で評価され (13) (14)、その後、欧洲動物実験代替法評価センター (EURL ECVAM) 科学諮問委員会 (ESAC) による独立したピアレビューを受けた (15)。入手可能な証拠のすべてを検討したところ、GARDskin は、有害性の分類および表示を目的に、感作性物質と非感作性物質との識別を支援するために IATA の一環として用いることが推奨されている。
4. GARD Data Analysis Application (GDAA) にホストされ、GARDskin 試験法の試験ガイドラインの補足文書 (7) に記載されているように、ESAC は、リングトライアルで得たデータのレビューに加えて、GARDskin 解析パイプライン全体とそのバイオインフォマティクスコンポーネントについても詳細なレビューを実施している。ESAC は、トレーニングデータセットの予測アルゴリズムを再現することができたほか、生データから被験化学物質の最終分類までのすべてのステップを検証し、再現することができた (15)。

5. フローサイトメトリーや RNA 抽出を含む通常の細胞培養技術と分子生物学的手法に熟練していれば、GARDskin は、未実施施設への技術移管が可能であることが実証されている（被験化学物質 N=28）。バリデーションのリングトライアルで得られた GARDskin の施設内再現精度 (WLR) のレベルは、欠測データポイント³ の一致も考慮した場合は 78.6~89.2%、欠測データポイントを除外した場合は 82.1~88.9% であった。同様に、施設間再現精度 (BLR) の推定値は、欠測データポイントの一致も考慮すると 82.1% であり、欠測データポイントを除外すると 92.0% であった (13) (14) (15)。

6. ESAC が要約して提示したヒト (16) および LLNA (17) のデータソースを組み込んだ重要度のエビデンス (15) を用いて、専門家の判断に基づいた分類基準データセットと比較した場合、バリデーション試験 (13) (14) で得られた結果は全体として、皮膚感作性物質（すなわち UN GHS 区分 1）と非感作性物質との識別に関して正確度 91.7% (N=28)、感度 92.4% (N=19)、特異度 90.1% (N=9) であった。バランス正確度は 91.2% であった。GARDskin のトレーニングデータセットと重複する被験化学物質を除外して、真に未検討の被験化学物質のみを検討したところ、皮膚感作性物質（すなわち UN GHS 区分 1）と非感作性物質との識別の正確度は 95.4% (N=17)、感度 96.6% (N=13)、特異度 91.7% (N=4) であった。バランス正確度は 94.1% であった。

7. GARDskin 法を提案した後、OECD は皮膚感作性の確定方式に関するガイドラインを発表した (18)。これにより、LLNA およびヒトのキュレーションされた参照データを含む化学物質の拡張データセットが公表された (19)。このキュレーションされた参照データを考慮に入れ、バリデーション試験 (13) (14) やその他の公表されている試験 (20) から得た GARDskin のデータを用いて GARDskin の予測性能を算出した。試験法開発中に使用した化学物質と重複する被験化学物質を含める場合と除外する場合の両方について計算を実施し、表 1A および 1B にそれぞれ要約する。ここに挙げた数値はバランスの取れていないデータセットに基づくものであるため、特異性の尺度は不確実と考える必要がある。

表 1A. LLNA またはヒトの参照データと比較した GARDskin の性能 (19)。計算には、試験法の開発中に使用した化学物質と重複する被験化学物質を含む。

	LLNA				ヒト	
	NS (N=11)		S (N=64)		NS (N=9)	
	NS	S	9.89	8.16	4.94	3.68
GARDskin ¹	S	1.11	55.9		4.06	23.3
正確度			87.6%			78.5%
感度			87.2%			86.4%
特異度			89.9%			54.9%
バランス正確度			88.6%			70.7%
N			75			36

¹ 混同行列は、ESAC が実施した GARDskin の結果の重み付け計算に基づく (15)。

³ 手順の項に記載した通り、許容基準を満たさなかったために有効な結果が得られなかつた化学物質。

表 1B. LLNA またはヒトの参照データと比較した GARDskin の性能 (19)。計算には、試験法の開発中に使用した化学物質と重複する被験化学物質は含まない。

	LLNA				ヒト	
	NS (N=5)		S (N=47)		NS (N=6)	S (N=18)
	NS	4.33	4.92			
GARDskin ¹	S	0.667	42.1		3.50	15.1
正確度		89.3%			73.4%	
感度		89.5%			84.0%	
特異度		86.7%			41.7%	
バランス正確度		88.1%			62.8%	
N		52			24	

¹ 混同行列は、ESAC が実施した GARDskin の結果の重み付け計算に基づく (15)。

8. 総合すると、上記情報は GARDskin が皮膚感作性の有害性を識別するのに有用であることを示している。ただし、この試験法は、IATAに基づく他の情報を併用し、「はじめに」の段落 7 および 8 の条項に従って検討する必要がある。

9. この方法の既知の限界は主に、溶解性の問題、溶媒ならびに水性細胞系との適合性に関連する。また、自家蛍光被験化学物質がフローサイトメトリーに基づく細胞毒性評価に悪影響を及ぼす可能性がある。既知の限界を、考えられる回避策とともに補遺 II に記載する。GARDskin 法は、有機官能基、反応メカニズム、皮膚感作性の強度、物理化学的特性がさまざまな被験化学物質に適用可能であることが示されている (12) (14) (20)。現在入手可能なデータによれば、適用範囲から除外される特定のクラスやタイプの化学物質はない。同様の結論が、報告されたデータに対する独立した専門家／専門家システムによるレビューから得られており、ESAC ピアレビュー用に提出されたデータパッケージにも記載されている (21)。正確な評価が本質的に困難であると考えられる化学空間サブセットに対して、分析法の適用可能性および予測性能が保たれていることは特筆に値する。このようなものに、脂溶性化合物 ($\log P > 3.5$) (20)、間接的作用性ハプテン (20)、金属化合物 (22) がある。

10. 単一成分化学物質の評価に関して、GARDskin 法をバリデートした。バリデーション試験で評価されていないものの、本試験法は、多成分物質および混合物の試験に技術的に適用可能である (20) (23)。用語の定義を補遺 I に示す。

実施施設習熟度の実証

11. GARDskin を日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、この試験法の実施における技術的習熟度を実証すること。習熟度は、補遺 III に記載された、感作性かどうかがわかっている規定の習熟度確認化学物質群を試験することによって実証する。この試験では試験系の応答性も確認する。習熟度確認化学物質の試験は、本稿に記載された手順を完全に遵守して実施し、結果が補遺 III に記載された区分に一致している必要がある。習熟度確認化学物質で得たデータの過去のデータベースを試験施設で保管し、試験法の再現性を経時的に確認する。

試験法の原理

12. GARDskin 法では、骨髓性白血病細胞株 MUTZ-3 のサブクローンである SenzaCell 株を DC の *in vitro* 代替モデルとして利用する。被験化学物質固有の曝露濃度で 24 時間にわたり被験化学物質に曝露し

たあと、分析の定量可能な測定値として、GARDskin GPS の遺伝子発現レベルを得る。これは、曝露細胞培養物から分離した総 RNA の測定値に基づいて、NanoString nCounter®システムを用いて評価する。

13. この高次元データを、サポートベクターマシン (SVM) 予測アルゴリズムをホストしている GDAA (24) を用いて分析する。このアルゴリズムは、検査法開発中に適切に学習され、固定されている (12)。被験化学物質に曝露した細胞培養物中の遺伝子発現レベルに基づき、GARDskin 予測アルゴリズムによる出力は、各被験化学物質が皮膚感作性物質 (UN GHS 区分 1) か非感作性物質かを予測する。

クラウドベースソフトウェア

14. GARDskin データ解析パイプラインは、GDAA と呼ばれるクラウドベースのバージョン管理ソフトウェアに基づいている。GDAA は、生データの前処理から被験化学物質の最終分類まで、データ解析のワークフロー全体を容易にする。GDAA は、公表されているガイダンス (25) (26) に従ってデータの完全性を保証するように設計されている。

15. 試験施設は、定期的ないし使用前に（リスク評価に基づいて）、クラウドベース GDAA ソフトウェアのすべての機能を確認することが望ましい (25) (26)。このため、過去の参照試験データセットをクラウドベースシステムにアップロードし、ソフトウェアで処理／解析する必要がある。この参照試験データセットの被験化学物質は、試験施設が指定するが、どの被験化学物質も、生成された決定値および Message-Digest アルゴリズム 5 (MD5) チェックサム値に関して、経時的に正確で再現可能な試験結果を生成する必要がある (27)。決定値および MD5 チェックサム値の詳細と説明については、本 TG のデータ解析および報告の項を参照のこと。ソフトウェアの定期的試験および使用前試験の結果を文書化し、（コンピュータ）システムの経時的な安定性を追跡する。

手順

16. GARDskin アッセイプロトコルは、Tracking System for Alternative methods towards Regulatory acceptance (TSAR) (28) で一般に入手可能である。実施施設で GARDskin 法を導入する場合、本プロトコルを用いることが推奨される。GARDskin 試験法の主要な構成要素および手順を以下の段落に記載し、GARDskin 法の手順の流れについて概要図を図 1 に示す。

17. GARDskin 法では、続けて行う 2 種類の実験で化学物質曝露を行う。第 1 段階では、GARD 入力濃度と呼ばれる、被験化学物質の細胞毒性から得られる適切かつ被験化学物質固有の曝露濃度を特定するため、細胞毒性評価実験を実施する。第 2 段階では、上で定義した GARD 入力濃度を用いて主刺激実験 (main stimulation experiment) を実施して、下流分析のために RNA を分離する。

18. 主刺激に関して独立した 3 回の生物学的反復実験を実施する。この GARDskin 手順の説明では、独立した生物学的反復実験を、i) 別個の培養細胞（すなわち、細胞バッチ）および ii) 別個に独立して調製した被験化学物質および対照を用いて実施する同一の実験と定義する。

19. GARDskin のエンドポイント測定、すなわち GARDskin GPS mRNA 転写産物の定量化を、NanoString nCounter 解析システムを用いて、GARDskin GPS の遺伝子に対応するプローブからなる CodeSet を使用して実施する。生成された遺伝子発現レベルの生データを、GARD Data Analysis Application (GDAA) を用いて分析し、GARDskin 予測モデルによって各被験化学物質を感作性物質か非感作性物質かのどちらかに分類する。

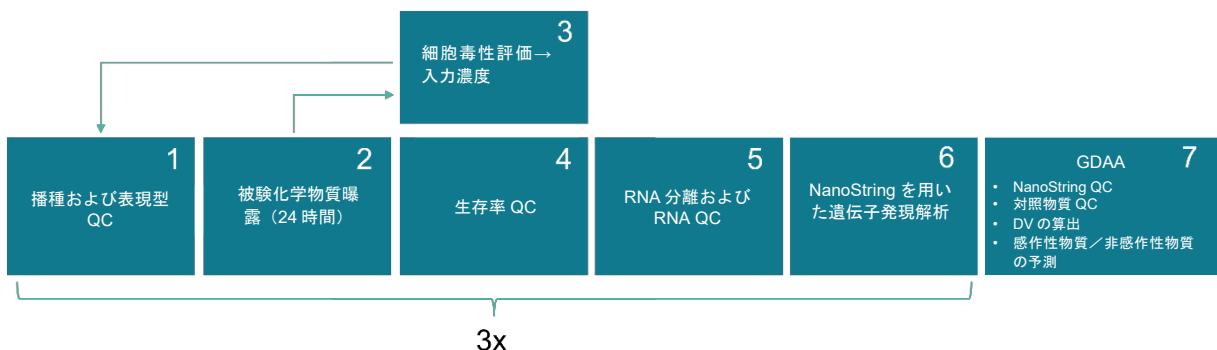


図1. GARDskin法の手順の流れの概要図。細胞毒性評価実験は要素1～4の順次組合せからなり、主刺激実験は要素1、2、4～6の順次組合せからなる。3回の独立した主刺激実験の完了後、要素7に記載したように、すべてのデータ解析についてGDAAを用いて実施する。QC：品質管理。DV：決定値。

細胞

20. ヒト骨髓性白血病由来細胞株 SenzaCell を GARDskin 法に用いる。SenzaCell 細胞株は、GARD 技術の適正な使用許可を得たのち、SenzaGen AB⁴ から入手可能である。SenzaCell 細胞株はドライアイス詰めで提供され、Good In Vitro Method Practices (GIVIMP) ガイダンス文書 (29) に従って-136°C 未満で保管する。SenzaCell 細胞株を、10% v/v DMSO (分子生物学グレード、99%以上) 添加細胞培地中で濃度 7×10^6 cells/mL に増殖し、液体窒素中で凍結する。

21. 細胞の扱いは、無菌条件下に抗生素質なしで実施する。SenzaCell細胞株を遠心分離する場合は、300~315 xg、5 分間、2~8°C で実施する。SenzaCell 細胞株のインキュベーションは、5% CO₂ および加湿雰囲気下 37°C で行う。SenzaCell 細胞株は、維持および増殖には細胞培養フラスコを、化学物質曝露には細胞培養プレートを用いる。SenzaCell 細胞株を、20% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS) および 40 ng/mL GM-CSF (プレミアムグレード、純度 > 97%、エンドトキシン濃度 < 0.1 EU/μg サイトカイン、活性 ≥ 5 × 10⁶ IU/mg) を添加した MEM/アルファ培地 (L-グルタミン含有、リボヌクレオシドおよびデオキシヌクレオシド含有) で増殖させる。培養細胞をカウントし、3~4 日ごとに 0.2 × 10⁶ cells/mL の濃度に分割する。解凍後の最大継代数は 16 回とする。細胞分割後、被験化学物質曝露のために細胞を直接播種する。その際、通常の細胞維持培養と同期するように被験化学物質曝露試験を計画する。細胞を平底の 12 ウェルプレートまたは 24 ウェルプレートに播種し、最終的な全ウェル容量をそれぞれ 4 mL および 2 mL とする。

⁴ SenzaGen AB
Medicon Village
SE-223 81 Lund, Sweden
info@senzagen.com

同等で再現性のある結果を示すことができる場合は、別の種類やサイズのプレートを使用してもよい。細胞毒性評価実験は継代数 4~16 で実施し、主刺激実験は継代数 6~12 で実施する。

表現型の品質管理手順および許容基準

22. 化学物質曝露実験の実施と同日に、未処理の細胞の表現型を評価する必要がある。こうすることにより、細胞が不活性状態を維持していることを確認し、表現型の変異を検出することができる。
23. フローサイトメータ分析における洗浄ステップはいずれも、洗浄用緩衝液を用いて実施する。これは、0.5~1% (w/w) BSA (Cohn 分画 V) 含有 PBS で 0.2 µm フィルター滅菌を要する。ヒト抗原 CD1a、CD14、CD34、CD54、CD80、CD86 および HLA-DR に対する標識モノクローナル抗体や、関連するポリクローナルアイソタイプ対照で細胞を染色する。フルオレセイン・イソチオシアネート (FITC) 標識抗体である抗 CD86 (BD Biosciences、#555657)、抗 HLA-DR (BD Biosciences、#347400)、抗 CD34 (BD Biosciences、#555821)、抗 CD1a (Agilent Dako、#F714101-2) およびマウスモノクローナル抗 IgG1-FITC (BD Biosciences、#555748) が推奨される。さらに、フィコエリトリン (PE) 標識抗体として抗 CD54 (BD Biosciences、#555511)、抗 CD14 (Agilent Dako、#R086401-2) 抗 CD80 (BD Biosciences、#340294) およびマウスモノクローナル抗 IgG1-PE (BD Biosciences、#555749) が推奨される。なお、細胞の生存率分析にはヨウ化プロピジウム (PI) (BD Biosciences、#556463) 50 µg/mL を使用する。ただし、機能的な類似性が実証され、記録されていれば、同等の抗体や生存率マーカーを使用してよい。なお、抗体の新しいロットごとに、SenzaCell 細胞株を用いて滴定を行い、飽和抗体濃度を決定する必要がある。抗体の染色は、試料あたり FITC 標識抗体 1 種と PE 標識抗体 1 種を用いた二重染色で行うことが望ましい。染色試料ごとに、約 0.2×10^6 個の細胞を染色前に 2 回洗浄する。インキュベーション後、染色した細胞を再度洗浄し、洗浄用緩衝液に再懸濁する。
24. フローサイトメータ（抗体の選択に基づき該当する場合は PE および FITC を検出可能なものの）を用いて試料を分析し、最低 10,000 イベントを記録する。プロバイダーの使用説明書に従って、フローサイトメータソフトウェアまたはその他の関連解析ソフトウェアでゲート解析を実施する。ゲーティング手順および細胞表面の表現型バイオマーカー発現の定量化に関する詳細については、GARDskin アッセイプロトコル (28) を参照のこと。
25. 得られた結果が表 2 に示す許容基準に適合する必要がある。いずれかのバイオマーカーが規定の範囲外である場合、その細胞バッチを化学物質曝露実験に使用してはならないほか、使用した抗体の特性を別の評価で検証する必要がある。

表 2. 生存率および表現型の品質管理（QC）の許容基準

パラメータ	許容基準 (%) ¹
表現型バイオマーカー	
CD86	10-40
CD54	+ (>90)
HLA-DR	+ (>60)
CD80	<10
CD34	+ (35-70)
CD14	+ (5-50)
CD1a	+ (10-60)
生存率染色	
PI 陰性細胞（絶対生存率）	≥84.5

¹ 「+」は陽性細胞の存在 (>0%) を示す。完全な陽性細胞集団である必要はない。括弧内の数字は、開発試験室の過去のデータに基づく予想範囲であるが、許容基準の一部ではない。SenzaCell 細胞株は不均一であることが知られているため、ばらつきが予想される。

GARD 対照の許容基準

26. GARDskin 評価ごとに、一連の対照を分析する。非刺激対照（細胞培養培地）および陰性対照（被験化学物質の溶媒）を、細胞毒性評価実験ごとに分析すること。非刺激対照、陰性対照および陽性対照 (*p*-フェニレンジアミン、PPD、CAS# 106-50-3) を、3 回反復の主刺激実験のそれぞれで分析する必要がある。
27. GARDskin 試験法の試験ガイドラインの補足文書 (7) および以下の データ解析の項に詳細に記載されているように、非刺激対照を、細胞バッチの絶対細胞生存率の測定、細胞毒性評価実験および主刺激実験における相対細胞生存率の計算や、データ解析ワークフローの正規化に使用する。
28. 陰性対照が、細胞毒性評価実験および主刺激実験で相対生存率 ≥ 95.5% であり、段落 76 に規定される GARDskin 予測モデルで非感作性物質に分類される必要がある。これにより、この方法の実験手順のいずれの段階でも細胞が活性化していないことを検証することができる。
29. 陽性対照（PPD）が、主刺激実験で相対生存率 84.5～95.4% であり、段落 76 に規定される GARDskin 予測モデルで感作性物質として分類される必要がある。これにより、実験中に使用した細胞が応答性を有し、感作性物質曝露時に活性化されることを実証することができる。

被験化学物質および対照物質の調製

30. 被験化学物質および対照物質は、試験委託者または供給元の指示に従って保管し、安定性を確保する。被験化学物質および対照物質の調製は、細胞曝露実験の当日に行う。
31. 被験化学物質を適合溶媒に溶解して、目標ウェル内濃度のストック溶液とする。分析法バリデーションに使用する適合溶媒の一覧を表 3 に示すほか、ゲノムワイド遺伝子発現レベルに対する影響が検出不能である最高目標ウェル内濃度も記載する。対応するウェル内濃度を、陰性対照に用いる。陽性対照は、目標ウェル内濃度の 1000 倍の濃度で DMSO に溶解するのが望ましい。試験法適合性を実証でき、十分な科学的根拠がある場合には、表 3 にない溶媒や、細胞培地に対する溶液の直接添加を用いてよい。溶媒

は、細胞毒性を引き起こさず、提案されているウェル内濃度で非感作性物質に分類されるものでなければならぬ。

表 3.本方法のバリデーション中に使用する GARDskin 適合溶媒の一覧。

溶媒	CAS 番号	最高ウェル内濃度 (%)
DMSO ≥99%	67-68-5	0.1
水 ¹	-	0.1

¹ 細胞培養グレード。

32. どの被験化学物質も最高目標ウェル内濃度を 500 μM とする。分子量が明らかにされていない被験化学物質については、特に推奨される濃度の根拠が示されない限り、経験的研究 (23) に基づく最高ウェル内濃度 100 μg/mL をデフォルトとして定める。

33. 選択した溶媒および細胞培地中の下流の全希釈液に対する被験化学物質の溶解性を、溶液の目視検査により確認すること。必要であれば、vortex ミキサーや加熱 (37°C) を用いて完全に溶解する。ただし、被験化学物質の安定性がそれによって損なわれないことが確実な場合に限る。被験化学物質が最高ウェル内濃度 500 μM で溶解しない場合、被験化学物質のウェル内濃度が最も高くなる溶媒を使用する。

34. 被験化学物質と溶媒の希釈効果および目標ウェル内濃度を考慮に入れて、選択した溶媒を用いてしかるべき濃度のストック溶液を調製する。通常、表 3 に示す溶媒を検討する。このストック溶液濃度が目標ウェル内濃度の 1000 倍であるように調製する。以下の例では、このようなストック溶液をストック溶液 A と呼ぶ。被験化学物質のストック溶液 A を、培地でさらに希釈してから（以下の例ではストック溶液 B と呼ぶ）、被験化学物質を培養細胞に添加するとよい。

35. ストック溶液 A がストック溶液 B に難溶性である場合（培地中の沈殿として認められることが多い）、ストック溶液 B 中の最高可溶濃度を使用する。

36. 科学的に妥当で、実際的な利益（被験化学物質の溶解性が高まるなど）がある場合、上に記載したストック溶液 A およびストック溶液 B を用いる希釈法を省略してよい。ただし、ここに記載したウェル内細胞濃度や、被験化学物質および使用溶媒の両方の最高ウェル内濃度のコンプライアンスが保たれる場合に限られる。このような場合、許容可能な代替法のひとつとして、ストック溶液 A からウェルへの直接希釈がある。同様に、最高ウェル内濃度に関する制限が異なる代替溶媒の使用が科学的に妥当とされ、適合性を確認した場合、ストック溶液 A、ストック溶液 B ともに別の濃度であってもよい。

細胞毒性評価実験

37. 細胞毒性評価実験の目標は、下流の主刺激で使用する GARD 入力濃度と呼ばれる被験化学物質別の曝露濃度を規定することである。GARD 入力濃度を、被験化学物質の溶解性および細胞毒性（どちらも、ここに記載する手順で求める）に基づいて定める。

38. 典型的な細胞毒性評価実験の模式図を、図 2 に示す。選択した溶媒を用いて被験化学物質の連続希釈を実施し、デフォルトの最高ウェル内濃度 500 μM (500 μM を下回る最高可溶濃度の場合もある) から始まる一連のストック溶液 A 濃度を得る。各希釈段階間には混合および vortex ミキサーの実施が推奨される。培地にしかるべき量のストック溶液 A を加えることにより、ストック溶液 A から、一連の濃度のストック溶液 B を調製する。溶解しやすくするため、必要に応じて、十分な vortex ミキサーや加熱 (37°C)

を実施してよい。この他に、使用溶媒をストック溶液 B 濃度で含有する培地（陰性対照）を、溶媒でしかるべきウェル内濃度となるように調製する。

39. 被験化学物質曝露のため、培養細胞の分割直後に、適切な細胞濃度（被験化学物質ないし対照のストック溶液の添加による希釈を考慮する）で細胞を播種する。被験化学物質を添加した後の最終ウェル内細胞濃度が 0.2×10^6 cells/mL でなければならない。

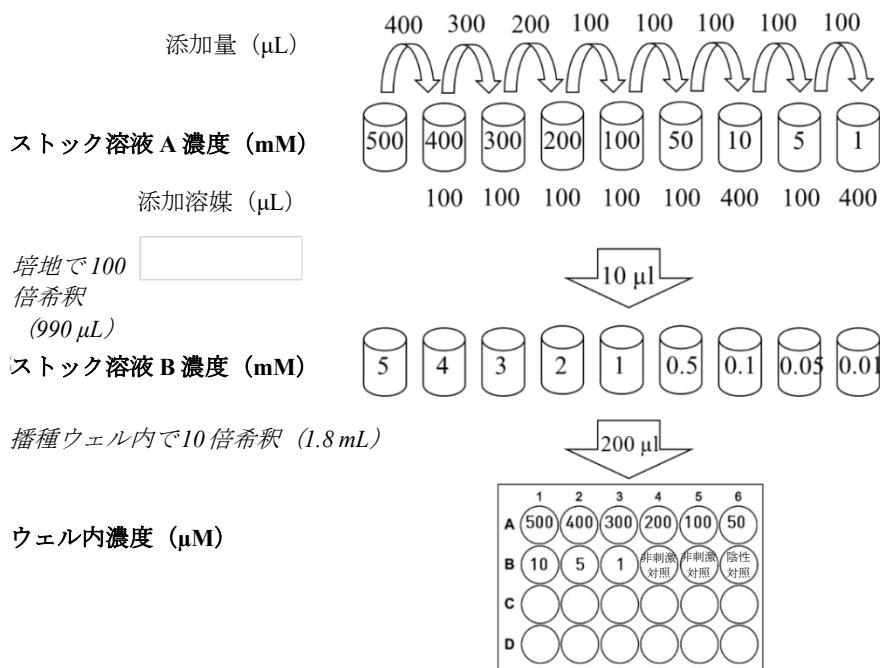


図 2. 24 ウェルプレートにおける化学物質の調製と典型的な細胞毒性評価実験の播種の模式図。培地を用いた希釈による、ストック溶液 A の連続希釈、ストック溶液 A からストック溶液 B への変換と、細胞播種および被験化学物質添加の後の典型的なプレート配置を示す。なお、各実験に非刺激対照および陰性対照を含める。

40. 被験化学物質および対照物質に曝露させた細胞培養プレートをプラスチック製プレート蓋で覆い、 $5\% \text{CO}_2$ の加湿雰囲気下 37°C で 24 時間インキュベートする。

41. 24 時間インキュベートした後、曝露した培養細胞の相対生存率（曝露していない培養細胞の絶対生存率との比較）を求める。フローサイトメトリーに基づく PI アッセイを使用する場合は、以下の手順が推奨される。

42. 各ウェルの細胞懸濁液をふたつのフローサイトメトリー試料に分割する。フローサイトメトリー分析のための染色および洗浄手順を、段落 23 に記載の通り、洗浄緩衝液で実施する。細胞を 2 回洗浄し、段落 23 の記載に従い、各試料を洗浄緩衝液と PI の 50:1 で染色する。試料を暗所で約 15 分間、 $2\text{--}8^\circ\text{C}$ でインキュベートする。細胞を約 1 mL で 1 回洗浄し、適量の洗浄緩衝液に再懸濁する。

43. フローサイトメトリー用技術的反復試料である i) 無染色の非刺激対照試料および ii) 染色済みの非刺激対照試料を得るために、非刺激培養細胞 2 連を要する。無染色の非刺激対照試料を用いて、分析時にゲ

ートを設定し、一方、染色済み非刺激対照試料を用いて、相対生存率を算出する（下記参照）。組み入れた2連の非刺激培養細胞を図2に示す。

44. 調製した試料を段落24の記載に従ってフローサイトメータで分析する。
45. PI染色試料の分析は、死細胞やデブリを排除せずに実施すること。
46. PE/FITCの散布図における細胞集団の輪郭を描いてPI陽性細胞およびPI陰性細胞のゲートを設定するのに、非刺激無染色試料を使用する。その後、PI陽性ゲートおよびPI陰性ゲートを、PE/FITC散布図のPI染色試料すべての分析に適用する。各試料についてPI陰性細胞の割合を記録する。これが絶対生存率の推定値である。式1に従い、各試料の相対生存率を算出する。被験化学物質の希釈範囲の濃度ごとおよび対照ごとに、2回反復試料の平均値を算出する。

$$Rv = \frac{V_S}{V_C} \cdot 100 \quad (1)$$

ここで

Rvは試料の相対生存率（%）である。

VSは試料の絶対生存率（%）である。

VCは、2つのPI染色非刺激対照試料の平均絶対生存率（%）である。

47. 対照は以下の基準に合格する必要がある；非刺激対照：平均絶対生存率84.5%以上、陰性対照：平均相対生存率95.5%以上。（なお、ここに挙げた基準は、主刺激の項および表4に詳しく記載したように、主刺激実験後の生存率管理許容基準の一部でもある）。

48. 被験化学物質の主刺激に使用するGARD入力濃度を以下の通りに選択する：

i) 細胞毒性を誘発する被験化学物質を、平均相対生存率84.5%～95.4%となる濃度で用いる。この濃度では、被験化学物質のバイオアベイラビリティが保証されると同時に、免疫反応を損なわない。複数の濃度が許容基準を満たす場合、90%に最も近い相対生存率が得られる濃度をGARD入力濃度として選択する。希釈範囲内の2つのデータポイントの間で相対生存率が95.5%以上から84.5%未満に低下する場合は、重要な濃度範囲に濃度を追加した細胞毒性評価実験をもう一度実施する必要がある。直線性を前提とすることができないため、データポイント間の内挿は推奨されない。

ii) 細胞毒性のない被験化学物質（相対生存率95.5%以上）は、濃度500 μMまたは最高可溶濃度で使用する。

iii) ストック溶液Aまたはストック溶液Bに溶解性の問題があり、細胞毒性を示さない被験化学物質の場合は、他の溶解性試験法（加熱や溶媒変更）を用いてウェル内濃度を高め、最高ウェル内濃度500 μMに近づけることができるかどうかをコントロールするために、被験化学物質を再評価する必要がある。

主刺激

49. 被験化学物質の入力濃度が明らかになれば、有効な独立した実験で主刺激を3回反復して実施する。このとき、独立して調製した被験化学物質および対照（非刺激対照、陰性対照、陽性対照）を用いるほか、異なる細胞バッチに由来する独立した培養細胞を用いて、3回の有効な生物学的反復試料を作成する。3回の主刺激は並行して実施しても順次実施してもよいが、必ず、被験化学物質、対照とともに、独立のストック溶液を用いる。同じ実験で複数の被験化学物質を分析する場合、どの被験化学物質も同じ溶媒に溶解しているのであれば、プレート数に関係なく、一連の同じ対照を使用する。同じ実験で異なる被験化学物質に異なる溶媒を使用する場合は、実験で使用する各溶媒に対応する陰性対照を追加する必要があ

る。図 3 に、8 種類の被験化学物質と 3 種類の対照を用いた 3 つの主刺激実験の模式図を示す。非刺激対照にひとつ余分のウェルがある。この例では、どの被験化学物質も同じ溶媒に溶解すると仮定しているため、組み入れる陰性対照はひとつである。

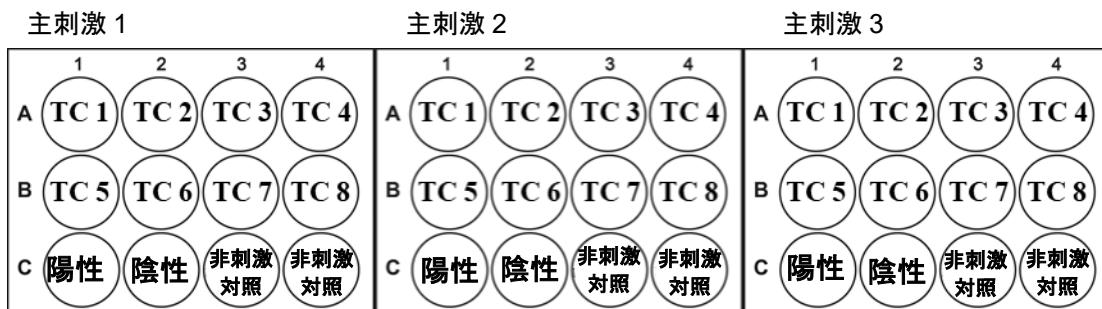


図 3.12 ウェルプレートを用いた 3 回反復の主刺激実験における 8 種類の被験化学物質および対照の模式図。TC = 被験化学物質。

50. 主刺激での播種手順は通常、段落 38~39 に記載した細胞毒性評価実験と同じである。ただし、各被験化学物質について 1 濃度のみを検討する点が異なる。典型的な手順の概要を以下に示す。

51. 被験化学物質の調製時に明らかになった適切な溶媒を用いて、適當な量の被験化学物質ストック溶液 A を調製する。必要に応じて vortex ミキサー や加熱 (37°C) などのしかるべき手段を適用して完全に溶解させる。

52. ストック溶液 B の濃度は、細胞培地に適量のストック溶液 A を加えて調製する（溶媒の最高ウェル内目標濃度による）。必要に応じて vortex ミキサー や加熱 (37°C) などのしかるべき手段を適用し、完全に溶解させる。

53. また、陽性対照および陰性対照を、適切なウェル内濃度になるように調製する。

54. 化学物質曝露のため、培養細胞の分割直後に、適切な細胞濃度（被験化学物質ないし対照のストック溶液の添加による希釀を考慮する）で細胞を播種する。被験化学物質を添加した後の最終ウェル内細胞濃度が 0.2×10^6 cells/mL でなければならない。

55. なお、正当な理由があり、動機がある場合、上記の細胞毒性評価実験の項に記載されているように、ストック溶液 B 希釀ステップを省略するという同じ選択肢が主刺激実験にも適用される。本稿に記載したストック溶液 A およびストック溶液 B に基づくのではない別の被験化学物質希釀法でも、目標ウェル内被験化学物質濃度、細胞濃度および最高溶媒濃度が満たされれば、許容される。

56. プレートをプラスチック製プレート蓋で覆い、5% CO₂ の加湿雰囲気下 37°C で 24 時間インキュベートする。

57. 24 時間のインキュベーションの後、細胞培養物を慎重に上下にピペットイングして混合し、それぞれのウェルから各細胞培養物を RNase フリーのマイクロチューブに分注し、フローサイトメトリー用試料を 2 回反復で作成する。

58. マイクロチューブ内の試料を用いて RNA を分離する。この目的のため、適切で目的に適合した試薬、例えば TRIzol 試薬 (Ambion, #15596018) を、供給業者の使用説明書に従って使用し、細胞ペレッ

トを溶解する。細胞溶解液試料は-70°C 以下で 1 年間保存できる。

59. 被験化学物質および対照のそれぞれについて、3回の主刺激のそれから複数の細胞溶解液試料を作成する。ただし、RNA 分離に使用し、さらに NanoString nCounter システムを用いて分析するのは、3 回の主刺激のそれから得た細胞溶解液試料ひとつで足りる。その他の細胞溶解液の反復試料については、主要細胞溶解液試料中の RNA 濃度が低いか RNA 品質が劣っている可能性があるため、バックアップ試料として保存する (-70°C 以下)。

60. ここに挙げたフローサイトメトリー試料については、段落 42~46 に記載されている細胞毒性評価実験と同じ洗浄、染色および分析手順に従う。

生存率品質管理の許容基準

61. PI 染色した試料を生存率の品質管理として使用し、被験化学物質および対照が必ず、表 4 に記載されている品質管理基準内の相対生存率ないし絶対生存率であるようにする。被験化学物質が、記載の許容基準にあてはまらない場合、下流の分析に使用してはならない。ひとつでも対照試料が記載の許容基準にあてはまらない場合、それが生じた主刺激実験の試料すべてを無視し、下流分析に使用しない。

表 4.生存率管理許容基準

被験化学物質または対照	許容基準 ¹
非刺激対照	絶対生存率 ≥ 84.5%
陰性対照	相対生存率 ≥ 95.5%
陽性対照	相対生存率 84.5%～95.4%
細胞毒性が予想される被験化学物質	相対生存率 84.5%～95.4%
500 μM または最高可溶濃度で評価する被験化学物質	相対生存率 ≥ 84.5%

¹記載している非刺激対照および陰性対照の許容基準は、細胞毒性評価実験と主刺激実験の両方に適用されるが、陽性対照および被験化学物質の許容基準は主刺激実験にのみ適用される。

RNA 分離

62. mRNA を含む総 RNA を、市販のキットおよび試薬を用いて溶解細胞試料から分離する。試験方法の開発およびバリデーションでは、Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research, #R 2052) を使用した。

63. RNA 分析装置、例えば、Agilent Bioanalyzer 2100 や同等の装置 (RNA 品質および RNA 濃度を約 5~500 ng/μL の範囲で測定する装置) を用いて、各試料の RNA 濃度を定量し、RNA 品質を分析する。機器供給業者が提供するプロトコルに従う。RNA の濃度および品質が NanoString の推奨事項に一致する必要がある。試験方法の開発およびバリデーションにあたっては、Agilent Bioanalyzer 2100 による RNA Integrity Number (RIN) 8.0 以上の試料を高品質試料とみなした。これと同じか同等の RNA 品質尺度を用いて、高品質 RNA を保証してもよい。

エンドポイント測定 ; NanoString nCounter®システムを用いた遺伝子発現解析

64. GARDskin アッセイのエンドポイント測定は、NanoString nCounter システムを使用したエンドポイント特異的 GPS である mRNA 定量である。NanoString nCounter プロトコルは、サーマルサイクラー (nCounter XT CodeSet 遺伝子発現アッセイ) を使用したハイブリダイゼーションステップを含むマニュアル処理から始まる。カスタムメイドの CodeSet (GARDskin GPS の遺伝子を代表するオリゴヌクレオチドプローブのセットで、この個々の遺伝子が GARDskin 試験法の試験ガイドラインの補足文書 (7) に記載されている) は、SenzaGen AB とのライセンス契約に基づいて NanoString が提供する。nCounter XT CodeSet 遺伝子発現アッセイに関する製造業者の使用説明書に従うこと。

65. nCounter XT CodeSet 遺伝子発現アッセイは自動試料処理で、nCounter カートリッジに対するプローブ/ターゲットの固定、デジタルデータの取得、カートリッジに固定されたプローブ/ターゲットのカラーコードの計数を、nCounter®装置を用いて実施する。nCounter 装置の使用説明書に従うこと。nCounter 装置の最も高い解像度および感度モードを使用すること。

66. NanoString nCounter システムで解析した各 RNA 試料に対し、NanoString の生データファイル、すなわち各標的分子の集計表を含むレポーターコードカウント (RCC) ファイルが作成される。

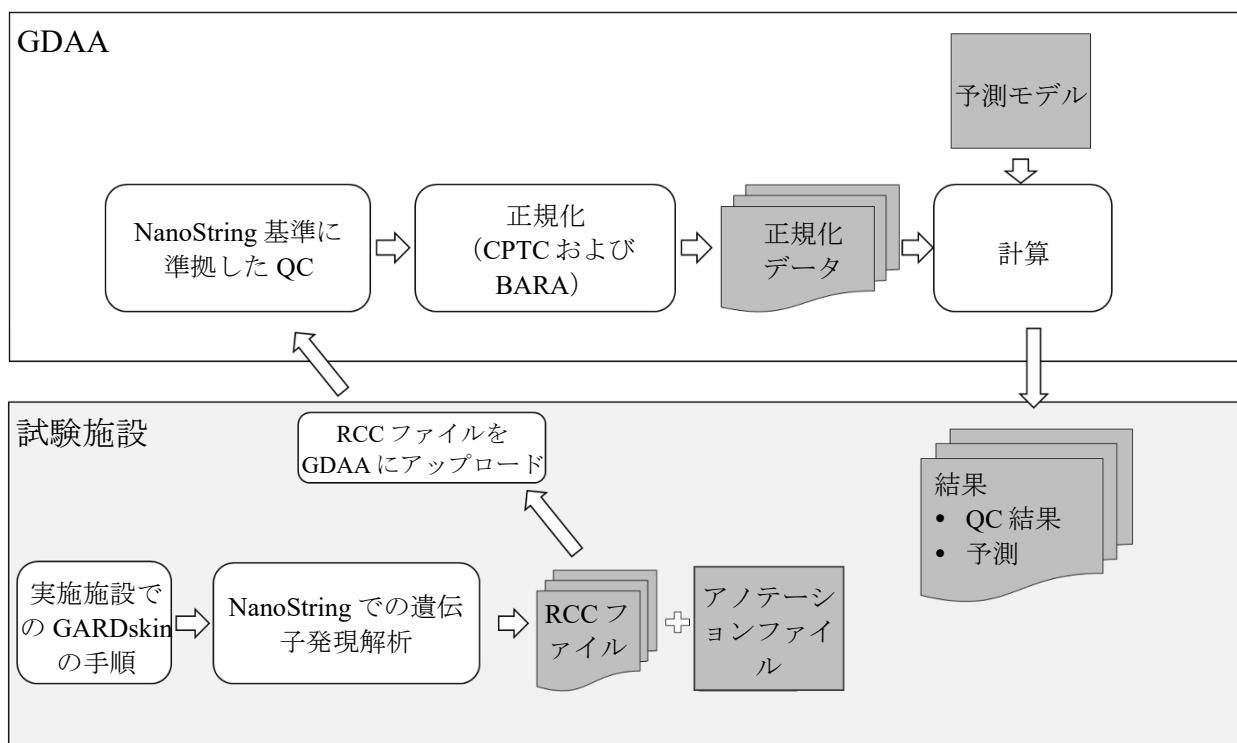
データ解析および報告

GARD データ解析アプリケーション

67. RCC ファイルの作成後、以下に要約するように、下流のデータ前処理、正規化、解析を GDAA ソフトウェアで実施する。このようなステップの詳細なレビューについては、GARDskin 試験法の試験ガイドラインの補足文書 (7) を参照のこと。GARDskin 解析パイプラインと GDAA はいずれも、方法のレビュー時に ESAC が広範囲にわたって評価した。ESAC はこのソフトウェアが目的に適っており、ユーザーフレンドリーであるとの結論を導いている。

68. GDAA はクラウドベースのアプリケーション (Amazon Web Services 上の Shinyapps) であり、Google Chrome、Mozilla Firefox、Microsoft Edge などのウェブブラウザがインストールされたインターネット接続コンピュータを必要とする。GDAA へのアクセスには、SenzaGen AB (www.senzagen.com) から取得するサービスレベル契約と有効なログイン認証情報が必要である⁵。

69. GDAA が、GARDskin 法を用いた予測生成に必要なすべてのデータ解析を実施する。GDAA の機能には、RCC ファイルの読み込み、アップロードされた各ファイルの NanoString nCounter 品質管理のチェック、Counts-per-Total Counts (CPTC) (12) アルゴリズムの段階的な適用とその後の Batch Adjustment by Reference Alignment (BARA) (30) による読み取りファイルの遺伝子発現値の正規化がある。最後に、GARDskin 予測アルゴリズムを用いて個々の試料を評価することにより、GARDskin 予測モデルによる被験化学物質の最終分類が可能となる。GDAA が実施する手順の模式図および他の手順との関係を図 4 に示す。



⁵ SenzaGen AB
Medicon Village
SE-223 81 Lund, Sweden
info@senzagen.com

図 4. 入力ファイルおよび出力ファイルを含む GDAA ワークフローの模式図。RCC = レポートコードカウント（遺伝子発現の生データ）、CPTC = Counts-per-Total-Counts（RNA 含有量の正規化）、BARA=Batch Adjustment by Reference Alignment（バッチ補正正規化）

70. GDAA による解析では、RCC ファイル（遺伝子発現レベルの生データを含む）およびアノテーションファイル（対照および被験化学物質を特定の RCC ファイルにマッピングするために使用する試料情報を含む）からなる 2 種類のファイルをアップロードする必要がある。なお、各被験化学物質の RCC ファイルを、同じ主刺激実験から得られた非刺激対照、陽性対照および陰性対照の RCC ファイルとともに分析する必要がある。これにより、BARA の正規化手順（GARDskin 試験法の試験ガイドラインの補足文書 (7) に詳述する）と、陰性対照および陽性対照の分類の両方が可能となり、許容基準が満たされているかどうか（許容基準の概要の項に定義）を評価することができる。

71. ファイルをアップロードすると、各 RCC ファイルは GDAA で自動的に品質チェックされる。表 5 に示す品質基準は、機器供給業者の推奨（デフォルト）許容基準から転載したものである。表 5 に示した各品質尺度の詳細が、GARDskin 試験法ガイドラインの補足文書に記載されている (7)。以下に示す品質管理基準のいずれかに適合しない試料は、その後の GARD データ解析に使用しない。GDAA は NanoString nCounter®品質管理許容基準に適合しない試料を自動的に不合格とする。

表 5. NanoString nCounter®品質管理許容基準の概要。¹

品質尺度	許容基準
画像品質	画像品質は、NanoString カートリッジの処理に成功したセクションの割合を示す。 > 0.75
直線性	直線性は、陽性スパイクイン対照を用いて推定した R2 値として表される。 > 0.95
検出限界	検出限界を、陽性スパイクインプローブ POS_E の測定値を陰性対照プローブの測定値と比較することにより評価する。プローブ POS_E は、ノイズレベルを超えて観測されると予想される最低濃度の陽性スパイクインプローブである。 < POS_E
結合密度	結合密度は、カートリッジ処理中に観察された画像彩度レベルで報告される。この値は、ロードした試料の量と NanoString ハイブリダイゼーションの有効性に依存する。 0.05 - 2.25

¹ 詳細は GARDskin 試験法の試験ガイドラインの補足文書 (7) を参照のこと。

72. GARDskin 解析の最後のステップは予測アルゴリズムの適用であり、以下の 予測モデルの項で説明するように、これによって GARDskin 予測モデルに対する入力データがもたらされる。

73. 完全な GARDskin 解析パイプラインの実施を容易にする他に、GDAA 機能には、MD5 チェックサムを計算するアルゴリズムを使用した、転送データの完全性の検証がある。MD5 アルゴリズムは任意の長さの入力データを取り込み、128 ビットフィンガープリントを計算する。これは特定の入力に対して常に同じフィンガープリントを生成し、2 つの異なるデータ入力が同じ出力を生成する可能性は極めて低い。このアルゴリズムのこのような特性は、データの完全性の検証に有用である。例えば、転送前に計算した 128 ビットのフィンガープリントと転送後に計算したフィンガープリントを比較することにより、転送し

たファイルの完全性を確認することができる。クラウドベースのソフトウェアの定期検査の項に記載されているように、このような MD5 チェックサムを、コンピュータシステムの定期的試験および使用前試験の一環として評価する。

予測モデル

74. GARDskin 予測アルゴリズムは、GDAA にホストされる SVM であり、方法開発中に適切に学習され、固定されている。この予測アルゴリズムの出力を決定値 (DV) と呼ぶ。式 2 に示すように、被験化学物質および対照からなる各反復試料に固有の DV を算出する。

$$DV = b + \sum_{i=1}^n w_i x_i \quad (2)$$

ここで、 n は変数の数（遺伝子、GARDskin では 196）、 b は定数（SVM の切片）、 w_i は変数 i の重み、 x_i は変数 i の正規化遺伝子発現値である。予測モデルがどのように定義されているかに関する詳細なレビューについては、GARDskin 試験法の試験ガイドラインの補足文書を参照のこと(7)。

75. 次に、3つの個々の反復試料の DV を、GARDskin 予測モデルに入力する。GARDskin 予測モデルは以下のように定義される：

76. 算出した平均 DV が 0 以上の被験化学物質を感作性物質（UN GHS 区分 1）に分類し、平均 DV が 0 未満の被験化学物質を非感作性物質に分類する。GARDskin 予測モデルの模式図を図 5 に示す。

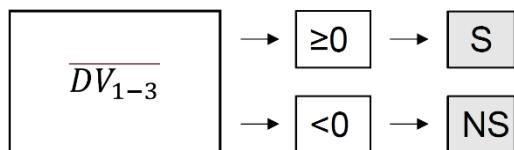


図 5. GARDskin 予測モデルの模式図。被験化学物質を、3 回の独立した実験から得られる 3 つの生物学的反復試料の平均値の正負により分類する。S：感作性物質。NS：非感作性物質。

許容基準の概要

77. GARDskin 法に規定された許容基準を以下に要約する。

- i) すべての細胞曝露実験は、表現型品質管理の許容基準に合格した SenzaCell 細胞バッチを用いて実施する（表 2）。これは、細胞毒性評価と主刺激実験の両方に適用される。
 - ii) 生成した RNA 試料はすべて、生存率品質管理の許容基準に合格した細胞実験から得たものでなければならぬ（表 4）。これは、3 回の（有効な）主刺激実験から得た全被験化学物質、陽性対照、陰性対照および非刺激対照試料に適用される。同様に、GARDskin 入力濃度を導いた細胞毒性評価実験が、該当するすべての生存率品質管理基準を満たす必要がある（表 4）。
 - iii) 生成したすべての RNA 試料が、NanoString nCounter® 品質管理（表 5）の許容基準に合格する必要がある。これは、3 回の（有効な）主刺激実験から得た全被験化学物質、陽性対照、陰性対照および非刺激対照試料に適用される。

- iv) 最終的な分類は、許容基準 (i)~(iii) に合格した 3 回の有効な反復生物学的試験に基づいて行う。
- v) 陽性対照および陰性対照がそれぞれ、GARDskin 予測モデルにより、感作性物質および非感作性物質に正しく分類される必要がある。

試験報告書

78. 以下の情報を報告すること。結果は表のかたちにし、該当する場合、実施した 3 回の実験の個々の試験結果と全体的な結果を記載する。

一般情報

- 試験依頼者名、試験施設名、試験責任者名および住所
- 使用した試験方法の参考先および説明

習熟度の実証

- 試験法の日常的な実施前に、試験施設が試験法に習熟していることを習熟度確認化学物質試験によって実証した旨の記述

GDAA システムの経時的な安定性の実証

- GDAA の定期的試験ないし使用前試験を、過去のデータセットを用いて実施し、必要な基準に合格した旨の記述。

被験化学物質および対照

- 供給元、バッチ／ロット番号、有効期限。化学的識別情報、例えば IUPAC 名または CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式やそれ以外の識別に有用な情報（バッチ／ロット番号、有効期限など）
- 外観、該当する場合は溶媒溶解度、分子量および入手可能な範囲のその他の物理化学的性質
- 曝露培地中の溶解性または不溶性、安定した分散に関する記述
- 純度、該当する場合で現実的に可能であれば純度、不純物の化学的識別情報など
- 被験化学物質の溶解に使用する手順
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性
- 各被験化学物質に対する溶媒／媒体選択の妥当性
- 各被験化学物質および対照に使用する溶媒（供給元を含む）

試験法の条件

- 細胞株、培養細胞 ID、その保存条件および供給元
- 本試験で使用する細胞培地成分（供給元を含む）
- 使用したフローサイトメトリー装置
- 本試験で使用した抗体および生存率マーカー（供給元を含む）
- 本試験で使用する RNA 分離キット、RNA 適格性確認キットおよび NanoString nCounter GARDskin コードセット（供給元を含む）

試験許容基準の結果

- 各実験からの表現型品質管理データ（各表現型バイオマーカーの陽性細胞の割合および細胞の絶対生存率）
- 被験化学物質、陰性対照、陽性対照および非刺激対照の細胞生存率品質管理データ
- 被験化学物質、陰性対照および陽性対照の NanoString nCounter 品質管理データ（画像品質、直線性、検出限界および結合密度）
- 陰性対照および陽性対照の分類

細胞毒性評価結果

- 試験濃度と妥当性

- 各被験化学物質濃度での相対生存率
- 選択した GARD 入力濃度の妥当性

主刺激の結果

- 被験化学物質 RNA 試料および対照 RNA 試料で測定した RNA の品質
- 利用可能なガイダンスに準拠したフォーマットにおける被験化学物質および対照の遺伝子発現レベル (RCC ファイルの内容) (31) (32)
- 本試験で使用した GDAA のバージョン番号
- アップロードした RCC ファイルの MD5 チェックサムと、ダウンロードした GDAA レポートの MD5 チェックサムの一一致に関する記述
- 被験化学物質、陽性対照および陰性対照について得た決定値（個々の試料あたりおよび平均値）
- 被験化学物質の分類
- 該当する場合、それ以外に関連する知見があればその記述

結果の考察

結論

参考文献

1. WO 2019/057977. Available at:
https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=EPODOC&II=0&ND=3&adjacent=true&loc_ale=en_EP&FT=D&date=20190328&CC=WO&NR=2019057977A1&KC=A1
2. Larsson K, Lindstedt M, Borrebaeck CA. Functional and transcriptional profiling of MUTZ-3, a myeloid cell line acting as a model for dendritic cells. *Immunology*. 2006;117(2):156-166. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02274.x
3. Hu, Z. B., Ma W., Zaborski, M., MacLeod, R., Quentmeier, H. and Drexler, H.G. (1996). Establishment and characterization of two novel cytokine-responsive acute myeloid and monocytic leukemia cell lines, MUTZ-2 and MUTZ-3. *Leukemia*, 10: 1025-40.
4. Quentmeier, H., Duschl, A., Hu, Z.B., Schnarr, B., Zaborski, M. and Drexler, H.G. (1996). MUTZ-3, a monocytic model cell line for interleukin-4 and lipopolysaccharide studies. *Immunology*, 89: 606-612.
5. Masterson, A.J., Sombroek, C.C., De Gruijl, T.D., Graus, Y.M., van der Vliet, H. J., Lougheed, S.M., van den Eertwegh, A.J., Pinedo, H.M. and Scheper, R.J. (2002). MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+ precursors. *Blood*, 100: 701-703.
6. Johansson, H., Lindstedt, M., Albrekt, A. S. and Borrebaeck, C. A. (2011). A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests. *BMC Genomics*, 12: 399
7. OECD (2022). Supporting document to the Test Guideline for the GARDskin test method. Series on Testing and Assessment No. 357: Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
8. Johansson, H., Albrekt, A. S., Borrebaeck, C. A. K. and Lindstedt, M. (2013). The GARD assay for assessment of chemical skin sensitizers. *Toxicol In Vitro*, 27 (3): 1163-9.
9. Johansson, H., Rydnert, F., Kuhnl, J., Schepky, A., Borrebaeck, C. and Lindstedt, M. (2014). Genomic allergen rapid detection in-house validation - a proof of concept. *Toxicol Sci.*, 139 (2): 362-70.
10. Forreryd, A., Johansson, H., Albrekt, A. S. and Lindstedt, M. (2014). Evaluation of high throughput gene expression platforms using a genomic biomarker signature for prediction of skin sensitization. *BMC Genomics*, 15 (1): 379.
11. Geiss, G. K., Bumgarner, R. E., Birditt, B., Dahl, T., Dowidar, N., Dunaway, D. L., Fell, H. P., Ferree, S., George, R. D., Grogan, T., James, J. J., Maysuria, M., Mitton, J. D., Oliveri, P., Osborn, J. L., Peng, T., Ratcliffe, A. L., Webster, P. J., Davidson, E. H., Hood, L. and Dimitrov, K. (2008). Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol.*, 26 (3): 317-25.
12. Forreryd, A., Zeller, K. S., Lindberg, T., Johansson, H. and Lindstedt, M. (2016). From genome-wide arrays to tailor-made biomarker readout - Progress towards routine analysis of skin sensitizing chemicals with GARD. *Toxicol In Vitro*, 37: 177-88.
13. EURL ECVAM. (2018). Genomic Allergen Rapid Detection (GARD) assay for skin sensitization. Report on the GARDskin validation study. Available at: <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2011-09>
14. Johansson, H., Gradin, R., Johansson, A., Adriaens, E., Edwards, A., Zuckerstatter, V., Jerre, A., Burleson, F., Gehrke, H. and Roggen, E. L. (2019). Validation of the GARDskin Assay for Assessment of Chemical Skin Sensitizers: Ring Trial Results of Predictive Performance and Reproducibility. *Toxicol Sci.*, 170 (2): 374-381
15. ESAC opinion on the scientific validity of the GARDskin and GARDpotency test methods. Available at: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC125963>. DOI: 10.2760/626728
16. Basketter, D.A., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Gilmour, N., Goebel, C., Hibatallah, J., Hoffmann, S., Kern, P., Martinazzi-Tessier, S., Maxwell, G., Reisinger, K., Sakaguchi, H., Schepky, A.,

- Tailhardat, M. and Templier, M. (2014). Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatitis*, 25 (1): 11-21. doi: 10.1097/DER.0000000000000003. PMID: 24407057..
17. Natsch, A., Ryan, C.A., Foertsch, L., Emter, R., Jaworska, J., Gerberick, F. and Kern, P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *J Appl Toxicol*, 33 (11): 1337-52. doi: 10.1002/jat.2868. Epub 2013 Apr 9. PMID: 23576290.
18. OECD. (2021). Guideline No. 497: Guideline on Defined Approaches for Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
19. OECD (2021). Series on Testing and Assessment No. 336: Annex 2 of the Supporting document to the Guideline (GL) on Defined Approaches (DAs) for Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
20. Forreryd, A., Gradin, R., Humfrey, C., Sweet, L. and Johansson, H. (2022). Exploration of the GARDskin applicability domain: Indirectly acting haptens, hydrophobic substances and UVCBs. Manuscript in press doi: 10.14573/altex.2201281.
21. Macmillan, D. 2018. GARD Applicability domain project. Supporting document for method peer-review, available online in the Tracking System for Alternative methods towards Regulatory acceptance (TSAR). Available at: <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2011-09>
22. Forreryd, A., Gradin, R., Rajapakse, N., Deag, E. and Johansson, H. (2022). The GARD™skin assay: Investigation of the applicability domain for metals. Manuscript in review.
23. Corvaro, M., Henriquez J., Settivari, R., Mattson, U.T., Forreryd, A., Gradin, R., Johansson, H. and Gehen, S. (2022). GARD™skin and GARD™potency: a proof-of-concept study to investigate the applicability domain for agrochemical formulations. Manuscript in preparation.
24. Cortes, C. and Vapnik, V. (1995). Support-Vector Networks. *Machine Learning*, 20 (3): 273-297.
25. OECD. (2016). OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and Compliance Monitoring No. 17: Application of GLP Principles to Computerised Systems. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm>
26. OECD. (2021). OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and Compliance Monitoring No. 22: GLP Data Integrity. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm>
27. Rivest, R. (1992). The MD5 Message-Digest Algorithm. IETF RCF1321. Available at: <https://www.ietf.org/rfc/rfc1321.txt>
28. EURL ECVAM. (2021). GARDskin Assay Protocol. Available at: <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/system/files/Published/GARDskin%20Assay%20Protocol%20TSAR.pdf>.
29. OECD. (2018). OECD Series on Testing and Assessment. No 286: Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP). Available at: <https://www.oecd.org/env/guidance-document-on-good-in-vitro-method-practices-givimp-9789264304796-en.htm>
30. Gradin, R., Lindstedt, M. and Johansson, H. (2019). Batch adjustment by reference alignment (BARA): Improved prediction performance in biological test sets with batch effects. *PLoS One*, 14 (2): e0212669.

31. OECD. (2021). Omics technologies in chemical testing, available at: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/omics.htm>
32. Harrill, J.A., Viant, M.R., Yauk, C.L., Sachana, M., Gant, T.W., Auerbach, S.S., Beger, R.D., Bouhifd, M., O'Brien, J., Burgoon, L., Caument, F., Carpi, D., Chen, T., Chorley, B.N., Colbourne, J., Corvi, R., Debrauwer, L., O'Donovan, C., Ebbels, T.M.D., Ekman, D.R., Faulhammer, F., Gribaldo, L., Hilton, G.M., Jones, S.P., Kende, A., Lawson, T.N., Leite, S.B., Leonards, P.E.G., Luijten, M., Martin, A., Moussa, L., Rudaz, S., Schmitz, O., Sobanski, T., Strauss, V., Vaccari, M., Vijay, V., Weber, R.J.M., Williams, A.J., Williams, A., Thomas, R.S. and Whelan, M. (2021) Progress towards an OECD reporting framework for transcriptomics and metabolomics in regulatory toxicology. *Regul Toxicol Pharmacol.* Oct; 125:105020. doi: 10.1016/j.yrtph.2021.105020.

補遺 I - 用語の定義および略語

試験法の開発者が定義した略語や GARD 法で用いる一部の計測器に固有の略語はイタリックで記載する。

ARE 抗酸化剤応答配列

BARA Batch Adjustment by Reference Alignment
データセット間に観察されるバッチ効果を減らすためのアルゴリズム

BLR 施設間再現精度

BSA ウシ血清アルブミン

CD 分化抗原群 細胞バッチ

本 TG では、固有の細胞バッチを以下の通りに定義する：

- 別の凍結バイアル由来の細胞、または、
- 同じ凍結バイアル由来の細胞を別に培養したもの別々の細胞バッチを得るための培養細胞の分割は、解凍後 3 繼代目以降に実施するほか、曝露実験前の 2 繼代以内に実施してはならない。

CPTC Counts-Per-Total-Counts

RNA 含有量を正規化するためのアルゴリズム

DB-ALM 動物実験代替法データベースサービス

DC 樹状細胞

DMSO ジメチルスルホキシド

DV 決定値

サポートベクターマシンからの定量可能な出力

ESAC ECVAM 科学諮問委員会

EURL ECVAM 歐州動物実験代替法評価センター

FBS ウシ胎児血清

FITC フルオレセイン・イソチオシアネート

GARD ゲノムアレルゲン迅速検出

本試験ガイドラインの主な主題である、免疫毒性学的エンドポイントのための一連の予測アッセイ

GARDskin 皮膚感作性のための GARD 試験法

この TG の主題。皮膚感作性物質の有害性評価に用いる方法

GARDskin 予測アルゴリズム

遺伝子発現の生データに基づいて、DV を出力するアルゴリズム。予測アルゴリズムの出力を、次に、予測モデルの入力として使用する。GARDskin 予測アルゴリズムは SVM である。DV、GARDskin 予測モデル、SVM を参照のこと。

GARDskin 予測モデル

被験化学物質または対照の 3 回反復 DV に基づいて、その GARDskin 分類を提供する経験則

GDAA GARD データ解析アプリケーション

GARD 法で生成した生データすべてについて、目的に適った自動データ処理と解析を行うためのクラウドベースのソフトウェア

GHS 世界調和システム

GM-CSF 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子

GPS ゲノム予測シグネチャ

全体で予測因子となる一群の遺伝子。この遺伝子発現量を、エンドポイント特異的なサポートベクターマシンである GARD 予測モデルに対する入力として用いる。GARD 予測モデルは試験方法開発中に適切に学習され、固定されている。エンドポイントが異なる GARD 法ごとに (GARDskin など)、別の GPS を用いる。

LLNA 局所リンパ節試験

LOD 検出限界

NanoString 機器のパラメータのひとつ

MD5 メッセージダイジェストアルゴリズム 5

入力データのデジタルフィンガープリントを生成する機能。GARDskin 法では、このようなフィンガープリントを使用してデータの完全性を検証する。

OECD 経済協力開発機構

PBS リン酸緩衝生理食塩水

PE フィコエリトリン

PI ヨウ化プロピジウム

RCC レポーターコードカウント
NanoString 機器が作成するファイルタイプ。遺伝子発現生データを保存する。

RIN RNA Integrity Number
Agilent 機器で使用する RNA 品質パラメータ

SVM サポートベクターマシン
監視あり予測モデルと、分類および回帰分析のためのデータを解析する関連学習アルゴリズム

TG 試験ガイドライン

WLR 施設内再現精度

補遺 II -GARDskin 法の既知の限界

表 AII.1.GARDskin 法の既知の限界および考えられる改変の要約。

物質クラス／悪影響	悪影響に考えられる結果	考えられる改変	物質の例
PI 検出波長に吸収や自家蛍光がある被験化学物質	細胞毒性評価結果に影響を及ぼし、不適切に規定された GARD 入力濃度を生じる可能性がある。	本稿に提案する方法と同等の結果が得られることが実証された場合、細胞毒性の評価に代替試薬を使用することによって回避できる。	シトラール (CAS# 5392-40-5)
正確な分子量が不明な物質。しかるべき GARD 入力濃度はモル濃度で規定されるため、被験化学物質は既知の分子量で表されることが望ましい。	GARD 入力濃度が不適切であると、誤分類を招く可能性がある。	下記により回避可能である - 重量ベース濃度 (ppm など) を用いる (1)。皮膚感作性物質の大多数が 100 ppm 未満で検出される (1)。 - 複雑な混合物の見かけの分子量を概算する。	UVCB、排出化学物質、組成が不定または完全に解明されていない製品または製剤、天然抽出物。
最終ウェル内濃度 500 μM で適切な溶媒に溶解できない被験化学物質および検討最高濃度で細胞毒性を示さない被験化学物質。	弱い皮膚感作性物質を検出するのに十分な曝露濃度が保証されない可能性がある。偽陰性となる可能性がある。しかし、利用可能なデータは、感作性物質の大多数が 100 μM 未満で検出されることを示唆している (1)。	500 μM 未満の最高可溶濃度で細胞毒性を誘発しない被験化学物質を、下流の GARDskin 手順に従ってさらに分析し、そこで得た陽性結果を、被験化学物質が皮膚感作性物質であるとの特定を支援するのに用いることができる。	n/a
被験化学物質が溶媒に適合しない。	不溶性または被験化学物質との反応干渉。これがると、不適切な GARD 入力濃度や誤分類、試験方法の完全な不適合を招く可能性がある。	科学的な根拠がある場合、代替可能な適合溶媒を使用してよい (2) (3)。このような代替溶媒の適合性は、ブランク溶媒を同じ曝露濃度で陰性対照として組み入れることによって確認する。被験化学物質が依然として不溶性である場合は、上記の十分に溶解しない被験化学物質の取扱いを参照のこと。	n/a
細胞系で速やかに加水分解する被験化学物質。	十分なウェル内濃度の被験化学物質が保証されない可能性がある。偽陰性となる可能性がある。		ヒドラジン (CAS# 2644-70-4)

参考文献

1. Gradin, R., Forreryd, A., Mattson, U., Jerre, A. and Johansson, H.(2021).Quantitative Assessment of Sensitizing Potency using a dose-response adaptation of GARDskin.Sci.Rep, 176 (2):423-432.
2. Forreryd, A., Gradin, R., Humfrey, C., Sweet, L. and Johansson, H.(2022).Exploration of the GARDskin applicability domain:Indirectly acting haptens, hydrophobic substances and UVCBs. 論文はレビューの段階にある。

3. Corvaro, M., Henriquez J., Settivari, R., Mattson, U.T., Forreryd, A., Gradin, R., Johansson, H. and Gehen, S.(2022).GARD™skin and GARD™potency: a proof-of-concept study to investigate the applicability domain for agrochemical formulations. 投稿準備中。

補遺 III—習熟度評価用の物質

表 AIII.1.GARDskin の技術的習熟度実証用の物質。

化学名	CAS 番号	物 理 的 状態	参照分類 ¹		予想 GARDskin 値（基準範囲）		
			LLNA	ヒト	分類	(DV)	(入力濃度、 μM)
4-ニトロベンジル プロミド	100-11-8	固体	S (非常に強い)	NA	S	(0 – 10)	<25
没食子酸プロピル	121-79-9	固体	S (強い)	NA	S	(2 – 13)	25 - 400
イソオイゲノール	97-54-1	液体	S (中等度)	S	S	(2 – 13)	>100
3-(ジメチルアミノ)- 1-プロピルアミン	109-55-7	液体	S (中等度)	NA	S	(0 – 11)	>250
オイゲノール	97-53-0	固体	S (弱い)	S	S	(0 – 10)	>100
エチレングリコール ジメタクリレート	97-90-5	液体	S (弱い)	NA	S	(2 – 20)	>25
グリセロール	56-81-5	液体	NS	NA	NS	(<0)	≥250
ヘキサン	110-54-3	液体	NS	NS	NS	(<0)	≥125
1-ブタノール	71-36-3	液体	NS	NA	NS	(<0)	≥250

¹ OECD TG 497 の補足文書の付属書 2 から抜粋 (1)。S : 感作性物質。NS : 非感作性物質。NA : 欠測値。

参考文献 hi

- OECD (2021).Series on Testing and Assessment No. 336:Annex 2 of the Supporting document to the Guideline (GL) on Defined Approaches (DAs) for Skin Sensitisation.Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.以下で入手可能：<http://www.oecd.org/env/testguidelines>