OECD/OCDE

2016/07/29

試験ガイドライン No.442E

In vitro 皮膚感作性：ヒト細胞株活性化試験（h-CLAT）

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません**。本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。

本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。

This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Reference:

OECD (2026), Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264264359-en.

©OECD(2016)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at

http://www.oecd.org/termsandconditions/

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 Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

化学物質の試験に関する OECD ガイドライン

In vitro 皮膚感作性：ヒト細胞株活性化試験（h-CLAT）

はじめに

1. 皮膚感作性物質とは、国連勧告「化学品の分類および表示に関する世界調和システム」（UN GHS）（1）により定義されているとおり、皮膚接触後にアレルギー反応を引き起こす物質のことをいう。本試験法ガイドライン（TG）は、UN GHS （1）に従い皮膚感作性物質と非感作性物質を識別するために用いられる *in vitro* 試験のヒト細胞株活性化試験（h-CLAT）について記したものである。

2. 皮膚感作性の原因となる主要な生物学的事象に関しては、広く意見が一致している。皮膚感作性に伴う化学的および生物学的機序に関する現在の知識は、有害性発現経路（AOP）（2）の形式で要約され、分子レベルの初期事象（molecular initiating event）から中間事象を通じ有害作用（すなわち、アレルギー性接触皮膚炎）に至るまでを含んでいる。この場合、分子レベルの初期事象（すなわち、1 つ目の主要な事象）とは、皮膚内に存在する蛋白質の求核中心と求電子物質との共有結合のことである。本 AOP における 2 つ目の主要な事象は角化細胞に起こり、炎症反応や、抗酸化剤／親電子性物質応答配列（ARE）依存性経路など特定の細胞シグナル伝達経路と関連する遺伝子発現の変化などが含まれる。3 つ目の主要な事象は樹状細胞（DC）の活性化であり、通常は特異的な細胞表面マーカー、ケモカイン、サイトカインの発現により評価される。4 つ目の主要な事象は T 細胞の増殖であり、これは、マウス局所リンパ節試験（LLNA）において間接的に評価される（3）。

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。広く知られている Magnusson/Kligman のモルモットを用いるマキシマイゼーション法（Guinea Pig Maximisation Test：GPMT）およびビューラー法（Buehler Test：TG 406 （4））は、皮膚感作性の誘導相と誘発相の双方を評価する。マウスを用いる局所リンパ節試験（LLNA：TG 429 （3））、ならびにその改変法で放射性同位元素を用いない LLNA：DA（TG 442A （5））および LLNA：BrdU-ELISA（TG 442B （6））は、すべて誘導相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、これらの試験も受け入れられている。

4. ごく最近では、化学物質に関する皮膚感作性の潜在的有害性を評価する場合、機序に基づく *in chemico* 試験法（皮膚感作性 AOP の 1 つ目の主要な事象を対象とした OECD TG 442C；

© OECD, （2016）
本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/に提示した諸条件に基づき、自由に使用してよい。
本ガイドラインは、2016 年 7 月 29 日に OECD 理事会が手順書に従って採択したものである［C（2016）103］。

ペプチド結合性試験）（7）および *in vitro* 試験法（皮膚感作性 AOP の 2 つ目の主要な事象を対象とした OECD TG 442D；角化細胞株レポーターアッセイ（ARE-Nrf2 Luciferase Test Method））（8）が有用であるとされている。ただし、現時点で評価に使用できる動物を用いない各々の試験法は、AOP の一部しか確認できていないことから、現在用いられている動物試験の完全な置換には、試験および評価に関する統合的アプローチ（IATA）の中で、動物を用いない試験法（*in silico*、*in chemico*、*in vitro*）を組み合わせる必要があると考えられる（2）（9）。

5. h-CLAT は、感作性物質に曝露後、ヒト単球性白血病細胞株の THP-1 における単球と DC の活性化による細胞表面マーカー（すなわち、CD86 および CD54）の発現量の変化を定量することで皮膚感作性 AOP の 3 つ目の主要な事象を評価する（10）。測定された CD86 および CD54 の細胞表面マーカーの発現量は、皮膚感作性物質と非感作性物質を識別するために用いられる。

6. h-CLAT 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）で評価された。入手可能な証拠と規制者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、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を識別するために IATA の一部として用いることが EURL ECVAM によって推奨された（11）。h-CLAT データの使用と他の情報との併用に関する例は、文献（12）（13）（14）（15）（16）（17）（18）（19）に報告されている。

7. 用語の定義を補遺 I に示す。

最初に考慮すべき事項および限界

8. 皮膚感作性物質は、DC の活性化に伴い細胞膜マーカーの発現を誘発すると報告されている（2）。そのため、DC の活性化に関連する単球活性のマーカーを測定する h-CLAT のような試験法は（20）、化学物質の皮膚感作性の評価に適していると考えられる。ただし、DC 活性化は皮膚感作性 AOP の 1 つの主要な事象のみを示すため、DC 活性化のマーカーを測定する試験法により得られる情報は、それ自体で、化学物質の皮膚感作性がないと結論づけるには十分ではない。したがって、h-CLAT により得られたデータは、IATA などの統合的アプローチに照らした他の補足情報（例えば、皮膚感作性 AOP の別の主要な事象を対象とした *in vitro* 試験の情報や、類似化学物質からの推定などの試験を伴わない情報）との組み合わせで検討すべきである。

9. 本試験法ガイドライン記載の試験法を用いることにより、IATA に照らして皮膚感作性物質

© OECD, （2016）

（すなわち、UN GHS におけるカテゴリー1）と非感作性物質を識別することができる。本試験法ガイドラインを単独で用いて、皮膚感作性物質を当局が UN GHS （1）で定義したサブカテゴリーである 1A および 1B に分類することはできず、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、h-CLAT での陽性結果を単独で用いて、化学物質を UN GHS におけるカテゴリー1 に分類できる場合がある。

10. 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実験室への技術移管が可能であることが確認されている。本試験法から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%であった（11）（21）。バリデーション試験（22）、および発表された他の研究（23）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（すなわち、UN GHS におけるカテゴリー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 12 記載のとおり、Log Kow が 3.5 を超える化学物質の陰性結果を含めないすべての既存データでの EURL ECVAM （21）による再解析に基づく）。h-CLAT での偽陰性結果の予測は、皮膚感作性の強度が高い（high）化学物質（すなわち、UN GHS におけるサブカテゴリー1A）よりも、皮膚感作性の強度が低い（low）～中程度（moderate）の化学物質（すなわち、UN GHS におけるサブカテゴリー1B）で懸念される可能性がより高い（12）（22）（24）。総合すると、これら情報は、h-CLAT は、皮膚感作性の有害性の識別に有用であることを示している。なお、本試験法は、IATA に照らし上記段落 9 の条項に従って、他の情報と組み合わせ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示され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 試験およびそれ以外の動物試験の結果は、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。

11. 「被験物質」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]、被験物質が単一成分物質、多成分物質、または混合物であるかは h-CLAT への適用を規定するものではない。現在入手可能なデータによると、h-CLAT は、各種有機官能基を含む被験物質の評価および反応メカニズム、（*in vivo* 試験で判定される）皮膚感作性の強度、物理化学的特性の検討に適用可能であることが示された（11）（23）（24）。多成分物質／混合物の試験に h-CLAT 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（24）。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。ただし、ある混合物について規制当局への提出を意図にデータを取得する場合、本試験法ガイドラインを用いる前に、目的に合った適切な結果が示され得るか、また、示される場合その根拠について検討する [2]。当該混合物の試験の規制要件がある場合には、こうした検

[1] 2013 年 6 月の合同会議において、可能な場合、新規および更新版の試験法ガイドラインでは、試験の対象となる物質を表現する「被験物質」という用語について、より一貫した使用を行うべきであることが合意された。

[2] 本文は、2014 年 4 月にテストガイドラインプログラム各国調整官作業部会（Working Group of National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme：WNT）で提唱、および合意された。

© OECD, （2016）

討は不要である。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得ることを考慮する。

12. h-CLAT は、適切な溶媒／媒体（段落 21 参照）に可溶であるか安定した分散液（すなわち、被験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）となる被験物質に適用可能である。Log Kow が 3.5 を超える被験物質は、偽陰性結果をもたらす傾向がある（23）。そのため、Log Kow が 3.5 を超える被験物質で得られた陰性結果は、判断に用いてはならない。ただし、Log Kow が 3.5 を超える被験物質で得られた陽性結果については、被験物質を皮膚感作性物質であると判断できる。さらに、h-CLAT に用いられる細胞株の代謝能が限定的であること（25）、また、h-CLAT の実験条件からプロハプテン（すなわち、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（すなわち、酸化により活性化される物質）も陰性結果を示す場合がある（24）。蛍光被験物質は h-CLAT で評価できるが（26）、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、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が、例えば、補遺 II 収載の習熟度確認物質により、それぞれ FITC 標識抗体（段落 31 参照）、または PI（段落 25 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、用いることができる。上記を踏まえて、陰性結果は、限られた範囲内の情報、および IATA の枠組み内の他の情報源とともに解釈すべきである。他の特定のカテゴリーに属す被験物質に h-CLAT が適用できない証拠が示される場合、h-CLAT は、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。

13. 上記のとおり 、h-CLAT は、皮膚感作性物質と非感作性物質を識別する。ただし、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（12）（13）（17）。それでもなお、h-CLAT の成績が、強度の評価の情報を与えるためには、望ましくはヒトデータに基づいたさらなる作業が求められる。

試験の概要

14. h-CLAT は、被験物質曝露 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（すなわち、CD86 および CD54）の変化を定量する *in vitro* 試験である。これらの表面分子は、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 活性化を再現する可能性がある。表面マーカー発現の変化は、蛍光色素で標識された抗体で細胞を染色し、フローサイトメトリーで測定される。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、その成績は、感作性物質と非感作性物質を識別するための予測モデル（段落 33 参照）に用

© OECD, （2016）

いられる。

習熟度の立証

15. 本試験法ガイドライン記載の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 18 参照）と、陽性対照および溶媒／媒体対照（段落 27～29 参照）により得られたデータの背景データベースを維持し、これらのデータを用いて、実施施設において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。

試験手順

16. 本試験法ガイドラインは、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 EURL ECVAM 動物実験代替法データベースサービス（DB-ALM）プロトコル No. 158 （27）に基づいている。実施施設において 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 段階から成る h-CLAT の主要な構成要素および手順について以下に記す。

細胞の調整

17. h-CLAT の実施には、ヒト単球性白血病細胞株の THP-1 細胞を使用する。使用する細胞（TIB-202™）は、ATCC（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得ることが推奨される。

18. THP-1 細胞は 5% CO_2 存在下、室温 37°C の湿気のある環境で、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くても良い。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、培養液に抗生物質を含まないことが、結果に影響を与えないという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 $0.1～0.2 \times 10^6$ cells/mL の密度で播種し $0.1～1.0 \times 10^6$ cells/mL の密度を維持する。細胞は、試験で使用する前に、反応性のチェックを行い、適正を判断する。細胞の反応性チェックは、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（$NiSO_4$）（CAS 番号：10101-97-0、純度 99%以上）の陽性対照と、乳酸（LA）（CAS 番号：50-21-5、純度 85%以上）の陰性対照を用いて、解凍 2 週間後に実施する。DNCB および $NiSO_4$ は、CD86 および CD54 の細胞表面マーカーで陽性反応を示し、LA は陰性反応を示さなければならな

© OECD, （2016）

い。反応性チェックで適正と判断された細胞のみが試験での使用が可能となる。細胞は、解凍後、最長 2 ヵ月を限度に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 27～31 記載の手順に従って実施する。

19. 試験では、0.1×10^6 cells/mL または 0.2×10^6 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。アレルゲンで誘発される CD86／CD54 の発現に影響を及ぼす可能性があるため（28）、前培養期間直後の培養フラスコの細胞密度は、（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一致させることが重要である。試験当日、培養フラスコから採取した細胞は、2×10^6 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（1×10^6 cell/well）あるいは 96 ウェル平底プレートに 80 µL（1.6×10^5cell/well）の細胞液を播種する。

用量設定試験

20. *用量設定試験*は、溶媒／媒体対照と比較して、細胞生存率（CV）が 75%となる被験物質濃度である CV75 を求めるために実施される。CV75 値は、*CD86／CD54 発現測定*の被験物質曝露濃度を判断する際に用いる（段落 27～31 参照）。

被験物質および対照物質の調製

21. 被験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 12 参照）。これらの溶媒／媒体のいずれを試みても被験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。十分な科学的根拠が提示される場合は、上記以外の溶媒／媒体を使用することが可能である。最終的な溶媒／媒体における被験物質の安定性は、考慮されなければならない。

22. 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）の被験物質の原液から、次の希釈段階を踏む：
    - 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 倍の段階希釈で 8 保存原液（8 濃度）を調製する。次にその保存原液を培養液（作業用溶液）でさらに 50 倍希釈する。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、最大濃度は、新たな細胞毒性試験を実施して求める。生理食塩水または培地で溶解または安定的に分散された被験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 倍の段階希釈で 8 保存原

© OECD, （2016）

液（8 濃度）を調製する。次にその保存原液を培養液（作業用溶液）でさらに 250 倍希釈する。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。

作業用溶液は、プレート中に THP-1 細胞懸濁液と同量加えることで（段落 24 参照）、被験物質濃度はさらに 2 倍希釈される（通常、プレートの最終濃度の範囲は 7.81～1000 μg/mL）。

23. h-CLAT で使用される溶媒／媒体対照は、培養液（培地または生理食塩水のいずれかで溶解または安定的に分散された被験物質（段落 12 参照）の場合）、または DMSO（DMSO で溶解または安定的に分散された被験物質の場合）の場合でもプレート中の最終濃度は 0.2%にする。作業用溶液については、段落 22 作業用溶液の記載と同じ希釈を行う。

被験物質および対照物質の適用

24. 段落 22 および 23 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 19 参照）で調製された細胞懸濁液と 1：1（v/v）で混合する。次に、処理したプレートを 5% CO_2 存在下、37°C で 24±0.5 時間インキュベートする。被験物質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、揮発性の被験物質の蒸発、および被験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（29）。

ヨウ化プロピジウム（PI）染色

25. 暴露から 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。上清は除去し、残りの細胞は、600 μL（96 ウェルの場合）、または 1 mL（24 ウェルの場合）の 0.1%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水（染色用緩衝液）で再懸濁する。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）に、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 1 mL（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（例として 400 μL）で再懸濁し、PI 溶液（例として 20 μL）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 と同様の結果が示される場合、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

26. 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 万の生細胞（PI 陰性）を観察する。細胞生存率は、サイトメーター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

© OECD, （2016）

を必要とする。

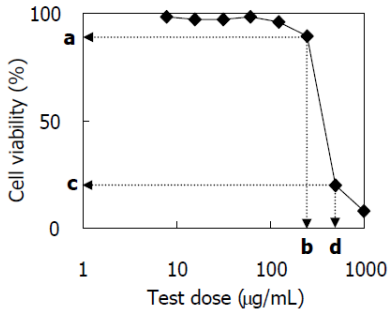
$$\text{細胞生存率} = \frac{\text{生細胞数}}{\text{観察総細胞数}} \times 100$$

CV75 値（段落 20 参照）、すなわち THP-1 細胞の 75%が生細胞（25%が細胞毒性）である濃度は、以下の式を用いて対数線形補間により算出する。

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

ここで：

a は、細胞生存率が 75%以上となる最小の生存率
c は、細胞生存率が 75%未満となる最大の生存率
b および d は、細胞生存率 a と c 点でそれぞれが示す濃度



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

被験物質および対照物質の調製

27. 適切な溶媒／媒体（生理食塩水、培地、または DMSO；段落 21 参照）は、被験物質を溶解または安定的に分散するために用いられる。まず、被験物質を*用量設定試験*（段落 26 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 が求められない場合（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物質の可溶、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、該当する溶媒／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 No. 158 を参照）で試験される保存原液（100×1.2 × CV75 から 100×0.335 × CV75（生理食塩水または培地の場合）または 500×1.2 × CV75 から 500×0.335 × CV75（DMSO の場合）の範囲の 8 濃度）を調製する。次にその保存原液をさらに培養液（作業用溶液）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。これら溶液は、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

© OECD, （2016）

ることになる。細胞生存率に関して、結果が段落 35 および 36 に記載の許容基準を満たしていない場合は、より正確な 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。

28. 溶媒／媒体対照は、段落 23 記載のとおり調製される。h-CLAT の場合に用いられる陽性対照は DNCB（段落 18 参照）とし、DMSO で保存原液を調製する。また、保存原液について段落 27 記載のとおり希釈する。DNCB は、*CD86／CD54 発現測定*の陽性対照としてプレート中の最終濃度は通常 4.0 μg/mL で使用される。プレートで DNCB の 4.0 μg/mL 濃度を得るためには、DMSO を用いて 2 mg/mL の DNCB 保存原液を調製し、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、各試験施設で求められた DNCB の CV75 も、陽性対照濃度として用いることができる。これ以外に、適切な陽性対照の場合、背景データがあり、実施許容基準を満たせば、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、被験物質について記載された基準（段落 35 参照）と同一であるが、陽性対照は単一濃度で試験されるため、最後の許容基準は除外する。

被験物質および対照物質の適用

29. 被験物質および対照物質ごとに、1 実験で予測結果を求める必要がある。各実験では、*CD86／CD54 発現測定*を独立して 2 回以上行う（段落 33 および 34 参照）。独立した各測定は、別の日に実施する。または、a）新たに被験物質の保存原液と作業用溶液、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、細胞は異なる培養フラスコから採取される）場合は、同日に実施する。ただし、細胞は同じ継代数由来でもよい。作業用溶液（500 μL）として調製された被験物質および対照物質は、500 μL の細胞懸濁液（1×10^6 cell）と 1 : 1 の比率で混合させ、細胞は、段落 27 および 28 の記載のとおり 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、各実験においては、被験物質と対照物質の各濃度の成績は一つ（n＝1）で十分である。

細胞染色および分析

30. 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 1mL 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もよい）。洗浄後は、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）含有の染色用緩衝液）で 4°C で 15 分間インキュベートする。ブロッキング後は、細胞を 96 ウェル丸底プレートまたはマイクロチューブで、180 μL ずつに 3 等分する。

© OECD, （2016）

31. 遠心分離後は、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 no. 158（27）に記載の抗体は、染色用緩衝液で 3 : 25（v/v、CD86（BD-ファーミンジェン、#555657；クローン: Fun-1）の場合）または 3 : 50（v/v、CD54（ダコ社、#F7143；クローン：6.5B5、および IgG1（ダコ社、 #X0927）の場合）に希釈して使用する。これら抗体の希釈条件は、最良の信号対雑音比（S/N 比）を得られるものとして、試験法の開発者から提供された。試験法開発者の経験に基づき、抗体の蛍光強度は、通常、異なるロット間で一致している。ただし、使用者は最適な濃度を決めるために、使用者が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 no. 158 （27）記載のとおり、抗体のクローン、または販売元の変更は、結果へ影響する場合があることに留意する。200 μL の染色用緩衝液で 3 回洗浄後、細胞を染色用緩衝液（例えば、400 μL）で再懸濁し、PI 溶液（例えば、最終濃度の 0.625 μg/mL を得るために 20 μL）、または別の細胞毒性マーカーの溶液（段落 25 参照）を添加する。CD86 および CD54 の発現量および細胞生存率は、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

32. CD86 および CD54 の発現量は、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、アイソタイプ抗体で処理された対照（ctrl）細胞および抗 CD86 あるいは抗 CD54 抗体で処理された細胞の MFI を用いて、溶媒処理細胞に対する化学物質処理細胞の相対蛍光強度（relative fluorescence intensity：RFI）を、次の式に従って算出する。

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

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 26 記載の式に従って算出する。

予測モデル

33. *CD86／CD54 発現測定*では、各被験物質は、1 つの予測（陽性または陰性）結果を求めるため、独立した 2 回以上の測定をする。h-CLAT による予測では、2 回の独立した測定の 2 回、または 3 回の独立した測定の 2 回において、以下の条件を 1 つ以上満たす場合に陽性とみなし、それ以外の場合は陰性とみなす（図 1）。

© OECD, （2016）

- CD86 の RFI が細胞生存率が 50%以上となるいずれかの濃度で 150%以上であること
- CD54 の RFI が細胞生存率が 50%以上となるいずれかの濃度で 200%以上であること

上記に基づき、最初の 2 回の測定が CD86 および／または CD54 においてどちらも陽性である場合、h-CLAT による予測は陽性とみなし、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においてどちらも陰性である場合、3 回目の測定をすることなく、（段落 36 の条項を十分に考慮の上）h-CLAT による予測を陰性とみなす。ただし、最初の 2 回の測定で 1 つ以上のマーカー（CD86 または CD54）で一致しない場合、3 回目の測定が必要となり、最終予測結果の多い方（すなわち、3 回中 2 回一致した結果）に基づく。この点において、各 2 回の独立した測定で、1 回が CD86 のみ陽性（以下 P_1 とする）で、もう 1 回が CD54 のみ陽性（以下 P_2 とする）の場合、3 回目が必要となることに留意する。この 3 回目が両マーカーにおいて陰性（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において陽性（P_1 または P_2）か、CD86 および CD54 とも陽性（以下 P_{12} とする）である場合、h-CLAT による予測を陽性と判定する。

© OECD, （2016）

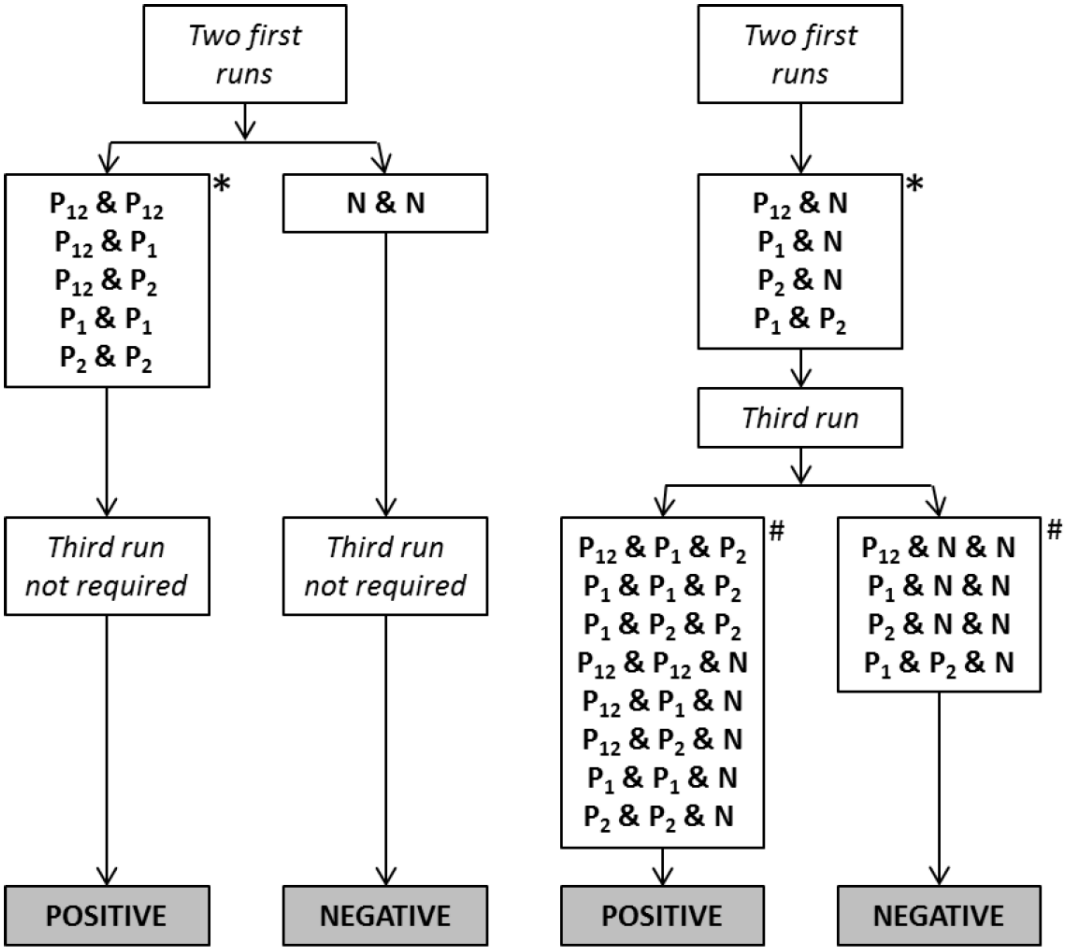


図１：h-CLAT で用いられる予測モデル。h-CLAT による予測は、IATA の枠組みの中で、また、段落 9、11 および 12 の条項に従って検討すること。P_1 : CD86 のみ陽性、P_2 : CD54 のみ陽性、P_{12} : CD86 および CD54 とも陽性、N : CD86 および CD54 とも陰性。*最初の測定から得た結果に関連する組合せを、その得られた順序とは関係なく枠内に示す。#上段の枠で示した最初の 2 回の測定で得られた結果に基づき、3 回目の測定結果に関連する組合せを枠内に示す。ただし、得られた結果の順序は反映していない。

34. h-CLAT で陽性と予測された被験物質の場合、CD86 では EC150、CD54 では EC200 の 2 つの効果濃度（Effective Concentrations： EC）、すなわち被験物質が 150 または 200 の RFI を誘発する濃度を、必要に応じて求められる。これらの EC 値は、IATA などの統合的アプローチ（12）（13）（14）（15）（16）の中で用いられた場合、感作性の強度の評価（3）が可能な場合がある。EC 値は、次の式により算出できる。

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

$$\mathbf{EC200（CD54 の場合）} = B_{濃度} + [(200 - B_{RFI}) \ / \ (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{濃度} - B_{濃度})]$$

ここで

© OECD, （2016）

$A_{濃度}$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（μg/mL）
$B_{濃度}$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（μg/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 のより正確な値を得るためには、独立した 3 回の *CD86／CD54 発現測定*が必要となる場合がある。そこで 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された EC の中央値として求められる。3 回のうち 2 回のみ陽性基準（段落 33 参照）を満たす場合は、算出された 2 つの値のより高い EC150 または EC200 の値が採用される。

許容基準

35. 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 値は、段落 32 記載の式を用いて算出する（「化学物質の MFI」は「溶媒／媒体の MFI」に、「溶媒／媒体の MFI」は「（培地）対照の MFI」に置き換える）。
- 培地および溶媒／媒体の両対照では、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（DNCB）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）を満たし、細胞生存率が 50%を超えること。
- 被験物質の場合、細胞生存率が各測定において少なくとも 4 つの試験濃度で 50%を超えること。

36. 陰性結果は、最高試験濃度において 90%未満（すなわち、段落 27 記載の段階希釈法に従って 1.2 × CV75）の細胞生存率を示す被験物質のみに当てはまる。1.2 × CV75 での細胞生存率が 90%以上の場合、陰性結果は無効とする。このような場合、再度 CV75 の求め、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 μg/mL、DMSO では 1000 μg/mL、または最高可溶濃度が、被験物質の最大試験濃度として用いられた場合、細胞生存率が 90%を上回っても陰性結果は許容されることに留意する。

© OECD, （2016）

試験報告書

37. 試験報告書には以下の情報を含む。

被験物質

- 単一成分物質
  - 化学的識別情報、例えば IUPAC または CAS 名、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
  - 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、適切なデータが可能であれば不純物の化学的同定など
  - 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）
  - 試験濃度
  - 入手可能な範囲の保存条件および安定性
  - 各被験物質についての溶媒／媒体選択の妥当性

- 多成分物質、UVCB 物質、混合物：
  - 入手可能な範囲の成分の化学的同定（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、粉砕）
  - 試験濃度
  - 入手可能な範囲の保存条件および安定性
  - 各被験物質についての溶媒／媒体選択の妥当性

対照物質

- 陽性対照
  - 化学的識別情報、例えば IUPAC または CAS 名、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
  - 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、適切なデータが入手可能であれば不純物の化学的同定など

© OECD, （2016）

・ 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）
・ 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ヒストリカルデータ

- 陰性および溶媒／媒体対照
・ 化学的識別情報、例えば IUPAC または CAS 名、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
・ 純度、適切なデータが入手可能であれば不純物の化学的同定など
・ 本試験法ガイドラインに記載以外の別の対照溶媒／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
・ 各被験物質についての溶媒／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（例えば、細胞株を入手した施設）
- フローサイトメトリー（例えば、機種）および機器の設定内容、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により本試験法実施の際に、実施施設の習熟度、および試験法の経時的な再現性の性能を立証するのに用いた手順。すなわち、背景対照データ、および／または反応性確認の背景データ

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
- 被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

© OECD, （2016）

- 試験手順の修正があればその記述

結果

- 測定ごとに被験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 MFI 値、RFI 値、細胞生存率、EC150／EC200 値（該当する場合）の一覧表、ならびに予測モデルに従って得られた被験物質の評価の提示
- 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

© OECD, （2016）

文献

1. 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/ghs_rev05/05files_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

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. Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, van Benthem J, Zuang V, Andersen KE, Angers-Loustau A, Aptula A, Bal-Price A, Benfenati E, Bernauer U, Bessems J, Bois FY, Boobis A, Brandon E, Bremer S, Broschard T, Casati S, Coecke S, Corvi R, Cronin M, Daston G, Dekant W, Felter S, Grignard E, Gundert-Remy U, Heinonen T, Kimber I, Kleinjans J, Komulainen H, Kreiling R, Kreysa J, Leite SB, Loizou G, Maxwell G, Mazzatorta P, Munn S, Pfuhler S, Phrakonkham P, Piersma A, Poth A, Prieto P, Repetto G, Rogiers V, Schoeters G, Schwarz M, Serafimova R, Tähti H, Testai E, van Delft J, van Loveren H, Vinken M, Worth A, Zaldivar JM. (2011), Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367-485.

10. 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.

11. 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

© OECD, （2016）

12. 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.

13. 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.

14. 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 potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489-504.

15. 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.

16. 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 Parmacol. 71, 337-351.

17. 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.

18. 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.

19. 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.

20. 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.

21. 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

22. 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

23. 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.

24. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y,

© OECD, (2016)

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.

25. 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.

26. 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.

27. DB-ALM (INVITTOX) (2014), Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Accessible at: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

28. Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato 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.

29. 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.

30. 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.

31. ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

32. 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.

© OECD, （2016）

補遺 I

定義

正確度：試験法による結果が、一般的に認められた参照値にどの程度一致するかを示す近似性の指標。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と同義的に用いられる（30）。

AOP（有害性発現経路）：分子レベルの初期事象から検討対象の *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（2）。

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、生物系、または（その下位に属す）生物集団がある物質に暴露された場合、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危険有害性の同定（可能性）、危険有害性の特徴付け（効力）、および／または安全性評価（可能性／効力および暴露）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、危険有害性の可能性、および／またはリスク、および／またはさらなる標的の必要性について規制上の意思決定情報を与えるため、試験の実施は最小化される。

培地対照：試験系のすべての構成成分を含む未処理を示す対照。本サンプルは、溶媒／媒体と試験系との相互作用の有無を判定するため、処理対象の被験物質およびその他の対照サンプルと処理される。

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：その定量的組成に、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

© OECD, （2016）

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）以上と 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られることにある。

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で処理を反復する対照。陽性対照反応の経時的変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：皮膚感作性を有するためには、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内の MFI との比較によって得られる化学物質で処理した細胞内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。妥当性には、試験法の正確性（一致度）への考慮が盛り込まれる（30）。

信頼性：同じプロトコールを用いて試験法を実施したときに得られる経時的な実験室内および実験室間再現性の程度を表す尺度。実験室内および実験室間再現性ならびに実験室内の繰り返し精度の算出により評価される（30）。

測定：溶媒／媒体対照および陽性対照で同時に検討される 1 つ以上の被験物質から成る一組の試験。

感度：すべての陽性や活性のある化学物質のうち、試験によって正確に分類されるものの割合。断定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（30）。

染色緩衝液：0.1%ウシ血清アルブミン含有のリン酸緩衝生理食塩水。

溶媒／媒体対照：用いる溶媒／媒体を含んだ試験系のすべての構成成分を含むが、被験物質は除いてある未処理サンプルのこと。同じ溶媒／媒体に溶解、または安定的に分散した被験物質で処理したサンプルについて、ベースラインの反応を確認するため用いられる。培地対照を同時に用

© OECD, （2016）

いた試験の場合、本サンプルは、溶媒／媒体と試験系との相互作用の有無も示す。

特異度：すべての陰性や不活性な化学物質のうち、試験によって正確に分類されるものの割合。断定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（30）。

物質：自然の状態の、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。

被験物質：「被験物質」という用語は、試験対象であることをいう場合に用いる。

国連勧告「化学品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、危険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危険有害性の種類およびレベルの基準に従って化学品（物質および混合物）の分類法を提案するとともに、絵表示・注意喚起語・危険有害性情報・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（1）。

UVCB 物質：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（30）。

© OECD, （2016）

補遺 II

習熟度評価用の物質

本試験法ガイドライン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、皮膚感作性の危険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とした。また、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とする（11）（23）。

表 1：h-CLAT 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 登録番号**		***In vivo* における予測** [1]	**（μg/mL²）の基準範囲**	**の h-CLAT 結果（EC150（μg/mL）の基準範囲）** [2]	**の h-CLAT 結果（EC200（μg/mL）の基準範囲）** [2]
2,4-ジニトロクロロベンゼン	97-00-7	固体	感作性物質（非常に強い［extreme］）	2-12	陽性（0.5-10）	陽性（0.5-1.5）
4-フェニレンジアミン	106-50-3	固体	感作性物質（強い［strong］）	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（中程度［moderate］）	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（中程度［moderate］）	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［weak］）	>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［weak］）	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 RN = CAS 登録番号（CAS Registry Number: CAS RN）

[1] *in vivo* における危険有害性（および強度）の予測結果は、LLNA データ（11）（23）に基づく。*in vivo* における強度は、欧州化学物質生態毒性および毒性センター（ECETOC）（31）により提唱された基準を用いて得られている。

[2] 既存の測定値（22）（32）に基づく。

[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。

© OECD, （2016）