

## 評価報告書

### 皮膚感作性試験：U937 Cell Line Activation Test (U-SENS™)

皮膚感作性試験資料編纂委員会

平成 30 年（2018 年）6 月 6 日

皮膚感作性試験資料編纂委員会

委員長 小島 幸一（一般財団法人 食品薬品安全センター）

委員 足利太可雄（国立医薬品食品衛生研究所）

安達 玲子（国立医薬品食品衛生研究所）

佐藤 一博（国立大学法人 福井大学）

武吉 正博（一般財団法人 化学物質評価研究機構）

福山 朋季（一般財団法人 残留農薬研究所）

## 要旨

皮膚感作性は化学物質の安全性評価において重要な評価項目であり、従来、モルモットやマウスを用いた動物実験によって評価されてきた。近年 EU における欧州化学品規制では、安全性評価はコンピューターを用いた定量的構造活性相関 (QSAR) モデルや *in vitro* 試験の代替法が推奨されており、動物実験によって安全性が評価された成分を含む化粧品の輸入販売が禁止 (2013 年 3 月全面施行) されたことから、動物を用いない *in vitro* 試験法の開発が強く望まれている。

U937 Cell Line Activation Test (U-SENS™)は、多くの皮膚感作性物質が樹状細胞を活性化することを利用し、ヒト組織球性リンパ腫細胞株である U937 細胞を用い、活性化に伴い細胞表面での発現量が増加する CD86 を測定することによって皮膚感作性の有無を判定する試験法である。本報告書は、この U-SENS™ について、TG 442E (2017)、EURL ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) によって実施されたバリデーション報告書、評価 (ピアレビュー) 報告書及び試験法開発者の投稿論文などを基に試験手順をまとめ、有用性と限界を評価したものである。

U-SENS™ は、感作性発現機序における第三段階のイベントである樹状細胞が活性化する際の細胞表面分子の発現亢進を利用した *in vitro* 試験法であり、化学物質の感作性を判断する上で重要な情報を与えてくれる。本法は、既に OECD TG 442E としてガイドライン化された h-CLAT と類似の方法である。

U-SENS™ では、マウスを用いる LLNA (Local Lymph Node Assay) の 1/5 程度の消耗品費で被験物質の皮膚感作性を判定することが可能と試算され、試験期間も LLNA に比べ短期であるため、経済性・迅速性の観点で有用性は高いと思われる。なお、細胞の反応性の確認と陽性対照および媒体対照のデータを集積し、ヒストリカルなデータベースを作成・維持し、試験系の再現性を保証する必要がある。

本試験法の EURL ECVAM によるバリデーション試験において、15 物質を用いて 4 施設で実施された施設内再現性の平均は 90%であった。また、38 物質を用いて 4 施設で行われた施設間再現性の平均は 84%であった。

OECD 試験法ガイドラインでは、ヒトに対する感作性の有無の分類で、Basketter らの報告に基づくヒトのクラス 5 と 6 を感作性無しとした場合、感度 100%、特異度 47%、正確度 77%、であった (クラス 6 のみを感作性無しとした場合は、感度 89%、特異度 65%、正確度 85%) (101 物質対象)。LLNA のデータがある 166 物質についての検討では、LLNA の結果に対して、感度 91%、特異度 65%、正確度 86%であった。この 166 物質を見る限り、本法では様々な化学物質の皮膚感作性の予測が可能であることが示されている。

なお、本法の開発者が当初提案した感作性判定予測モデル (OPM: Original Prediction Model) は、OECD 専門家会議においてより簡便な予測モデル (APM: Actual simplified Prediction Model) に変更されたが、上記の施設内および施設間再現性と、*in vivo* との対応性の値は APM を反映したものである。

U-SENS™ で評価した 175 物質と h-CLAT で評価した 142 物質のうち、LLNA のデータがある共通物質は 104 物質であった。この 104 物質について、感度、特異度、正確度を比較したところ、両者での予測性は概ね同様と判断された。

U-SENS™ の試験法は、液相での反応を必要とする試験系であるため、培地あるいは DMSO に 50 mg/mL の濃度で溶解あるいは安定的な分散液であれば試験が可能である。

本試験法は、強度感作性物質 {United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN GHS) 1A 分類} に比べて、軽度から中等度感作性物質 (UN GHS 1B 分類) で偽陰性の判定が生じやすい傾向にあるため、本法単独での感作性強度分類や UN GHS のサブカテゴリー分類への利用には適さない。

界面活性剤等の細胞膜の構造変化を引き起こすような物質、測定に使用する FITC (Fluorescein isothiocyanate) や PI (Propidium iodide) と同一の波長に強い蛍光を有する物質、揮発性を有する物質などでは、適切に評価されない可能性がある。プレハプテンやプロハプテンに関しては、本法開発の段階では正しく判定されたとしているが、ウェル中での化学的な酸化の進行については未知であり、また、本試験法に用いる細胞の薬物代謝能は限定的であるため、活性化に酸化や代謝系を必要とする化学物質では、正しくその感作性が検出されない可能性がある。

本委員会は、上記の本試験法の様々な限界を勘案すると、本試験法単独では皮膚感作性の判定は不十分で有り、証拠の重み付けや他の試験法との組合せで用いることを推奨する。

## 1. 緒言

皮膚感作性を評価することは化学物質の安全性評価において重要である。化学物質の皮膚での接触感作性のリスクを動物で予測する試験法としてモルモットを用いる皮膚感作性試験 (OECD TG 406) やマウスを用いる局所リンパ節試験 (LLNA, OECD TG 429) がある。LLNA には、<sup>3</sup>H-Methyl]-thymidine 取込量を測定する方法以外に、放射性同位元素 (RI) を使用せずに ATP 量を測定する LLNA : DA (OECD TG 442A) や Bromodeoxyuridine 取込量を測定する LLNA : BrdU-ELISA (OECD TG 442B) がある<sup>1)</sup>。

EU において、欧州化学品規制 (REACH: Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) では、安全性評価においてはコンピューターを用いた定量的構造活性相関 (QSAR) モデルや *in vitro* 等による代替法の活用が推奨されており<sup>2)</sup>、EU 化粧品規則 (EC No 1223/2009) では、動物実験により安全性が評価された成分を使用した化粧品の販売が禁止された<sup>3)</sup> (2013 年 3 月全面施行)。そのため、化学物質の皮膚感作性を判定する代替法の開発が強く求められている。

*In chemico* 試験法としてペプチド結合反応を利用した Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA : OECD TG 442C)、*in vitro* 試験法としてケラチノサイト細胞系の標的遺伝子を用いた ARE-Nrf2 Luciferase Test Method (OECD TG 442D) および単球系細胞の活性化を利用した human Cell Line Activation Test (h-CLAT : OECD TG 442E ANNEX I) が OECD から試験法ガイドラインとして公表されている<sup>1)</sup>。また、これら以外に h-CLAT 同様、単球系細胞の活性化を利用した U-SENS™ 及び IL-8 Luc assay などの皮膚感作性試験の *in vitro* 法が提案されており、ECVAM 等においてバリデーション研究が行われてきた。

U-SENS™ は、多くの皮膚感作性物質が樹状細胞を活性化することを利用し、ヒト組織球形リンパ腫細胞株である U937 細胞を用い、活性化に伴い細胞表面での発現量が変化する CD86 を測定する試験法である。U-SENS™ のバリデーション研究の結果については、ESAC

による評価（ピアレビュー）が完了し<sup>4)</sup>、OECD 専門家会議における議論により予測モデルが変更された後、2017年10月にOECDの試験法ガイドラインリストに追記された（OECD TG 442E ANNEX II）<sup>1)</sup>。以下本文中では、本法の開発者が当初提案した感作性判定予測モデル(OPM)による結果と、OECD 専門家会議において変更されたより簡便な予測モデル(APM)による結果の両方を記載した。

JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会（以下、委員会）は、U-SENS<sup>TM</sup>の皮膚感作性試験代替法としての科学的妥当性について、現在までに公開されている情報をもとに評価したので、その結果を報告する。

## 2. 試験法の原理

皮膚感作性は、ヒトでは接触皮膚炎、動物（齧歯類）では接触過敏症として知られる化学物質の毒性の一つである。OECD がまとめた Adverse Outcome Pathway (AOP)<sup>5)</sup>では、化学物質による皮膚感作は次の4つの Key event から成るとされている。

- 1) 化学物質とタンパク質のシステイン残基あるいはリジン残基との共有結合
- 2) ケラチノサイトにおける炎症性応答及び Antioxidant/electrophile response element (ARE) -dependent pathway による遺伝子発現
- 3) 樹状細胞の活性化（特異的細胞表面マーカーの発現、ケモカインやサイトカインの産生）
- 4) リンパ節における T 細胞の増殖

U-SENS<sup>TM</sup>は上記の第3の Key event に対応する試験法である。その基本的原理は単球及び樹状細胞の活性化マーカーである CD86 の発現量の変化を定量化することによって、感作性物質と非感作性物質の判別を行う手法であり、既に OECD TG 442E としてガイドライン化された h-CLAT と類似の方法である。CD86 は抗原提示細胞が T 細胞に抗原提示する際に T 細胞表面の CD28 と相互作用する補助刺激分子であり、樹状細胞の抗原刺激後の分化成熟に伴い発現量が増加することが知られている。抗原提示による T 細胞の活性化に際し、T 細胞受容体 (TcR) を介するシグナルと共に CD86/CD28 を介する刺激が極めて重要な役割を担っていることから、感作性物質の判別に有用と考えられる。

本法に用いる U937 細胞はヒト組織球性リンパ腫患者から単離された細胞株<sup>6)</sup>であり、h-CLAT で使用する単球性白血病患者由来の THP-1 細胞<sup>7)</sup>と同様に骨髓幹細胞由来の細胞である。いずれの細胞もサイトカイン等の刺激によって樹状細胞様の細胞に分化可能であることが報告されており<sup>8)</sup>、感作性物質の刺激による CD86 の発現上昇が確認されていることから、感作性物質のスクリーニングに利用可能と考えられる。

U-SENS<sup>TM</sup>では U937 細胞に検体である化学物質を添加して約 45 時間培養した後に CD86 の発現量を蛍光標識した特異的抗体を用いてフローサイトメトリーにより相対蛍光強度を測定し、溶媒のみを作用させた媒体対照の相対蛍光強度との比率 (Stimulation Index, S.I.) を基に判定を行う。

### 3. 試験手順／判定

U-SENS™の試験手順および判定は、被験物質を曝露した U937 細胞における CD86 陽性細胞率と細胞毒性検査によって構成される。

#### 3-1. 細胞調製、試薬および反応性確認試験

U-SENS™ではヒト組織球性リンパ腫細胞株である U937 細胞を使用する。細胞は American Type Culture Collection (ATCC) のような信頼のおける細胞供給元から入手することが望ましい (Clone CRL1593.2)。

U937 細胞は、培養用培地 (RPMI-1640 の基礎培地に 10% Fetal Calf Serum (FCS)、2 mM L-Glutamine、100 units/mL Penicillin および 100 µg/mL Streptomycin を加えたもの) にて、1.5 もしくは  $3 \times 10^5$  cells/mL の細胞濃度で播種し、2 もしくは 3 日ごとに継代を行い維持する。細胞濃度は  $2 \times 10^6$  cells/mL を超えないように留意し、Trypan blue で細胞生存率が 90%以上であることを確認する。使用する細胞、FCS、抗体は各ロットについて、試験実施前に反応性の確認を行う。反応性の確認は細胞の起眠から少なくとも 1 週間培養した後に行い、陽性対照物質として Picrylsulfonic acid (TNBS, CAS NO. 2508-19-2, 純度 99%以上) および陰性対照物質として Lactic acid (LA, CAS NO. 50-21-5, 純度 85%以上) を用いる。反応性は TNBS で 1, 12.5, 25, 50, 75, 100 µg/mL、LA で 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/mL の各 6 濃度で確認する。TNBS では CD86 発現率に濃度依存性の陽性反応が得られ、LA では CD86 発現率に陰性反応が得られなければならない。反応性確認を 2 回実施し、いずれも合格した細胞バッチのみを本実験に使用することができる。U937 細胞は融解後 7 週間まで継代させることができ、継代数が 21 を超えないように留意する。

試験実施前に、U937 細胞を 3 もしくは  $6 \times 10^5$  cells/mL の細胞濃度で培養フラスコに播種し、それぞれ 2 日もしくは 1 日間培養する。実験日に、 $5 \times 10^5$  cells/mL の濃度で新しい培養用培地に再懸濁した U937 細胞を 96 穴平底プレートに 100 µL ずつ加える (各 well あたりの最終細胞数は  $0.5 \times 10^5$  cells/well)。

#### 3-2. 被験物質および対照物質の調製

試験実施前に被験物質の溶解性を確認する。被験物質が培養用培地で、50 mg/mL の溶解もしくは安定的な懸濁状態が得られる場合は、培養用培地を媒体の第一候補とする。被験物質が培養用培地で実験に適した状態を得られない場合、Dimethyl sulfoxide (DMSO, 純度 99%以上) を媒体の第 2 候補とする。被験物質が培養用培地に溶解する場合、0.4 mg/mL を終濃度として調製し、被験物質が DMSO にしか溶解しない場合は、50 mg/mL を保存溶液として調製する。

被験物質および対照物質は、実験当日に調製する。U-SENS™では用量設定試験を行わないため、初回実験では終濃度として 6 濃度 (1, 10, 20, 50, 100 および 200 µg/mL) となるように培養用培地もしくは、DMSO を 0.4% 含んだ培養用培地で調製し、実験を行うべきである。2 回目以降の実験では、1 回目の実験結果を踏まえて少なくとも 4 濃度を用いて実験を行う。培養用培地もしくは 0.4% DMSO で調製した使用液は、等量の U937 細胞懸濁液と混合し、目標濃度を得る。よって使用液は目標濃度の 2 倍となるように調製する必要がある。

る (200 µg/mL の終濃度を得る場合は倍の 400 µg/mL を調製する)。目標濃度は、それまでの実験結果をもとに 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 から 4 濃度以上を選択し、実験に供する。

U-SENS™で用いる媒体対照は、培養用培地もしくは DMSO を 0.4%含有した細胞培養培地とする。

U-SENS™で用いる陽性対照物質は、培養用培地で調製した TNBS とする。TNBS は CD86 発現測定陽性対照として、プレート中の終濃度が 50 µg/mL となるような 1 濃度を使用し、70%以上の細胞生存率であることを確認する。TNBS がプレート中に 50 µg/mL となるようにするには、1M の保存溶液 (293 mg/mL) を細胞継代培地で調製し、培養用培地で 2,930 倍希釈することで 100 µg/mL の使用液を得る。陰性対照物質としては、LA のプレート中終濃度が 200 µg/mL となるように培養用培地で調製し用いる。各実験のプレート毎に、無処置区、媒体対照区、陰性対照区および陽性対照区を 3 well ずつ設定する。

### 3-3. 被験物質および対照物質曝露

3-2 で調製した被験物質および対照物質の使用液や媒体対照液と細胞懸濁液とを 96 穴平底プレート内にて 1:1 で混合し、37°C、5% CO<sub>2</sub> in Air 条件下にて 45±3 時間培養する。揮発性の高い被験物質の場合は、ウェル間での被験物質の交差汚染が生じる可能性があるため、プレートをシールするなどの処置を施す。

### 3-4. 細胞の染色

曝露開始 45±3 時間後に、細胞懸濁液を V 底 96 穴プレートに移し、遠心分離により細胞を沈降させる。上清を捨て、100 µL の氷冷 5%FCS 含有リン酸緩衝生理食塩水 (FCS 含有 PBS) で 1 回洗浄する。遠心分離後、回収した細胞を 100 µL の FCS 含有 PBS で再懸濁し、5 µL (0.25 µg) の FITC 標識抗 CD86 抗体 (BD-Pharmingen, #555657, Clone: Fun-1 もしくは Caltag/Invitrogen, #MHCD8601, Clone: BU63) またはマウス IgG1 アイソタイプ抗体 (BD-Pharmingen, #555748 もしくは Caltag/Invitrogen, #GM4992) を添加し、4°C、暗所で 30 分間静置する。抗体染色後の細胞は、100 µL の FCS 含有 PBS で 2 回、100 µL の氷冷リン酸緩衝液で 1 回洗浄した後、氷冷リン酸緩衝液(サンプルチューブでマニュアル測定する場合は 125 µL、プレートを用いて自動測定する場合は 50 µL)で再懸濁し、測定直前に PI 液 (終濃度が 3 µg/mL)を添加する。

### 3-5. フローサイトメトリー解析

CD86 発現率と細胞生存率はフローサイトメトリーで解析する。細胞は大きさ (FSC: Forward Scatter Chanel) と顆粒含有量 (SSC: Side Scatter Chanel) を基に計数し、結果を対数で表示し、デブリスを除去した細胞集団 (R1) を選択する。この R1 内の細胞が 10,000 個となるように各 well/チューブごとに細胞のカウントを行う。R1 の細胞を、FL3 (または FL4) と SSC でさらに展開し、PI 陰性 (FL3 が陰性) の生細胞集団を R2 として選択する。細胞生存率は以下の式にて算出する。細胞生存率が低い場合は、死細胞を含む 20,000 個までの条件、もしくはカウント開始後 1 分間のデータを解析することもできる。

$$\text{Cell Viability} = \frac{\text{Number of living cells}}{\text{Total number of acquired cells}} \times 100$$

FL1 陽性細胞 (CD86 陽性) の解析は、生細胞集団 (R2) を FL1 と SSC で展開することで行う。S.I.は媒体対照区と被験物質曝露区の CD86 陽性細胞率を基に下記の計算式より求める。

$$\text{S.I.} = \frac{\% \text{ of CD86}^+ \text{ treated cells} - \% \text{ of IgG1}^+ \text{ treated cells}}{\% \text{ of CD86}^+ \text{ control cells} - \% \text{ of IgG1}^+ \text{ control cells}} \times 100$$

### 3-6. CV70 値と EC150 値の計算法

3.5.で得られた結果を基に、CV70 値 (U937 の細胞生存率が 70%を示す被験物質濃度) および EC150 値 (CD86 の S.I.値が 150%を示す被験物質濃度) を下記の計算式より求める。

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

V1: 細胞生存率が 70%以上の、最低の細胞生存率

V2: 細胞生存率が 70%未満の、最高の細胞生存率

C1 と C2: V1 および V2 を示す被験物質濃度

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

C1: CD86 S.I.値が 150%未満の、最大被験物質濃度

C2: CD86 S.I.値が 150%以上の、最小被験物質濃度

S.I. 1: 濃度 C1 のときの S.I.

S.I. 2: 濃度 C2 のときの S.I.

EC150 および CV70 は測定毎に算出し、CD86 陽性率の被験物質濃度依存性を確認するために使用される。また、被験物質曝露区ないし対照区の平均値を用いて算出する。

### 3-7. 予測方法

CD86 発現測定では、それぞれの被験物質の予測 (陰性もしくは陽性) を行うために、各測定は少なくとも 4 濃度、さらに少なくとも 2 回の独立した測定 (別日に実施) を行う。

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) 全ての濃度で 150%未満であり、しかも被験物質の溶解性や細胞毒性のように結果に影響を及ぼすような要因がない場合、その測定における結果は陰性と判断する。一方で陰性以外の全ての場合 (S.I.値が 150%以上、結果に影響を及ぼすような要因が存在等) は、その測定における結果を陽性と判断する。

- 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™における予測は陰性とする。また、最初の2回の測定において陰性であれば3回目の測定は行う必要がない。
- 少なくとも2回の独立した測定において陽性であれば U-SENS™における予測は陽性とする。また、最初の2回の測定において陽性であれば3回目の測定は行う必要がない。
- U-SENS™では濃度設定試験を行わないことから、最初の測定において細胞毒性の見られない最も高い濃度でのみ CD86 発現の S.I.値が 150%以上であった場合は、その結果を不十分 (NC: Not Conclusive) と判断し、濃度を追加した測定を少なくとも別途2回実施する。3回目までの結果で判断ができない場合（2回目と3回目の結果が分かれた場合）は4回目の測定を行い、その測定結果を U-SENS™における予測とする。2回目以降の測定では、細胞毒性のない最も高い濃度でのみ S.I.値が 150%以上であったとしても、陽性と判断する。

U-SENS™における予測のフローチャートを図1に示す。

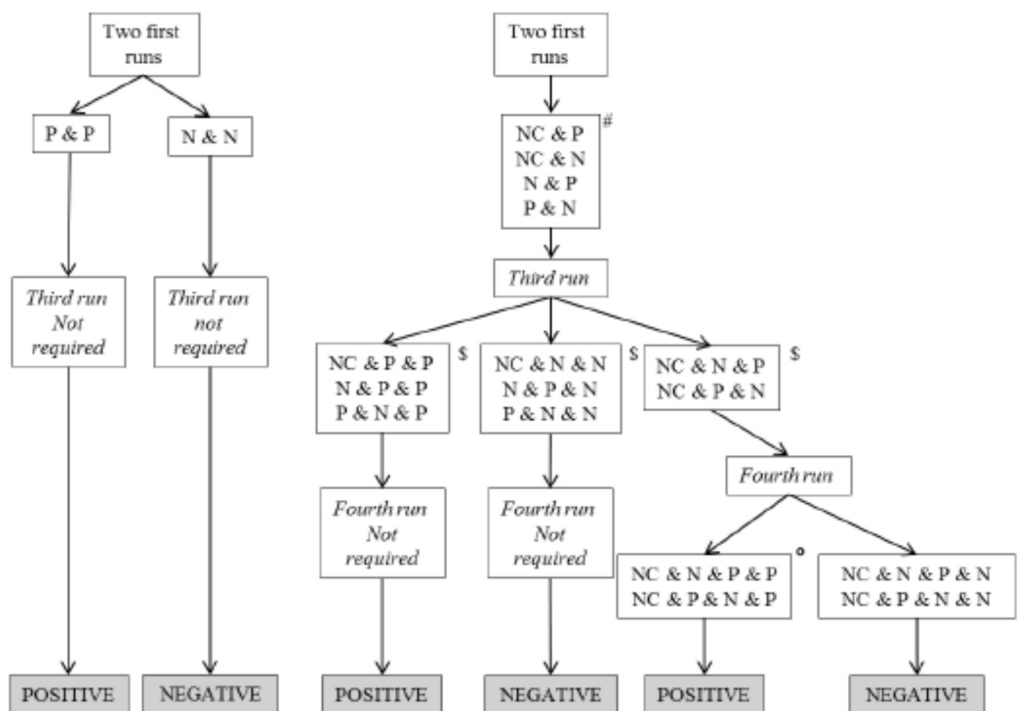


図1 U-SENS™における予測フローチャート

N: CD86 が陰性かつ結果に影響を及ぼすような事象が認められない場合

P: CD86 が陽性または結果に影響を及ぼすような事象が認められる場合

NC: 最初の測定で、細胞毒性のない最高濃度でのみ CD86 の陽性反応が認められた場合

#: 最初の測定で NC が認められた場合は自動的に3回目までの測定が必要となり、3回目までに予測ができない場合は4回目の測定を行う

\$: 最初の2回の測定結果との組み合わせ

°: 最初の3回の測定結果に基づいて実施された4回目までの測定結果の組み合わせ

### 3-8. 試験成立の条件

U-SENS™においては、以下の条件が成立する必要がある。

- 45±3 時間の被験物質曝露終了時に、3 well 設定した無処置 U937 の細胞生存率の平均が 90%より高く、かつ、その CD86 発現率が 2%以上 25%以下である。
- DMSO を媒体とした場合、DMSO 媒体対照区 3 well における細胞生存率の平均が、90%より高くなければならない。さらに DMSO 媒体対照区 3 well の CD86 S.I.の平均は、無処置区平均の 250%未満である。
- 3 回測定のうち少なくとも 2 回で、無処置区における IgG1 アイソタイプコントロールに対する CD86 発現率が 0.6%以上 1.5%未満である。
- 陰性対照区 (LA) の CD86 S.I.が 3 well 中 2 well で陰性 (CD86 S.I.が 150%未満) でかつ細胞生存率が 70%以上でなければならない。
- 陽性対照区 (TNBS) の CD86 S.I.が 3 well 中 2 well で陽性 (CD86 S.I.が 150%以上) でかつ細胞生存率が 70%以上でなければならない。

### 3-9. 試験手順および判定方法に関する h-CLAT との比較

本試験法は樹状細胞の活性化を指標にした検査法であることから、同様に樹状細胞の活性化に着目した h-CLAT 法との共通点が多い。以下に U-SENS™および h-CLAT の試験手順および判定方法の比較を示す。

	U-SENS	h-CLAT
使用細胞株	U937 (ヒト組織球性リンパ腫細胞株)	THP-1 (ヒト単球性白血病細胞株)
培養用培地	RPMI-1640に10% FCS、L-Glutamine、抗生物質を添加	RPMI-1640に10% FCS、メルカプトエタノール、抗生物質を添加
継代頻度	2~3日おき	2~3日おき
用量設定試験	なし	CV75を決定するために必要
適用可能被験物質濃度	200 µg/mL	5000 µg/mL (生理食塩水及び培地) 1000 µg/mL (DMSO)
被験物質の曝露時間	45±3時間	24±0.5時間
評価方法	細胞生存率とCD86発現率	細胞生存率、CD54およびCD86の相対蛍光強度 (RFI)
予測方法	CD86 S.I.値の150%を基準に2~4回の独立した測定を行い予測する	CD54 RFI値200%、CD86 RFI値150%を基準に2~3回の独立した測定を行い予測する

両試験法は、使用する細胞株が異なるが、培養用の培地、継代方法および継代頻度等の細胞の準備について大きな差異は認められなかった。基本的な被験物質の曝露方法は両試験で共通であったが、試験に使用できる最高被験物質濃度が h-CLAT で 5000 µg/mL (生理食塩水及び培養用培地の場合) ないし 1000 µg/mL (DMSO の場合) なのに対し、U-SENS™では 200 µg/mL であった。被験物質の曝露時間は h-CLAT の 24 時間に対し、U-SENS™では 45 時間が必要であり、細胞の反応性や評価方法の差異が要因と考えられた。試験評価は、h-CLAT が CD54 と CD86 という 2 種類の樹状細胞関連因子の相対蛍光強度を使用して

いるのに対し、U-SENS<sup>TM</sup>は CD86 の発現率を使用している。また、先行の h-CLAT に対して U-SENS<sup>TM</sup>では蛍光強度ではなく発現率を使用している。試験成立条件は、方法の違いに応じて若干の相違があるものの、基本的には同様と考えられた。予測方法は、先行の h-CLAT を参考に U-SENS<sup>TM</sup>の予測フローチャートが作成されていることから、基本的な方針は同様であったが、U-SENS<sup>TM</sup>では用量依存性を指標に入れているため 4 回目測定の可能性が考慮されていた。

#### 4. 精度

本法の技術移転性、施設内再現性、施設間再現性は EURLECVAM によって評価されている<sup>9)</sup>。

##### 4-1. 技術移転性

4 つの感作性物質 TNBS, 1,4-Phenylenediamine (PPD), Abietic acid (AA), 4,4,4-Trinitro-1-Phenylbutane-1,3-dione)と 1 つの非感作性物質 LA の 5 物質を用いて、技術移転性を評価している<sup>9)</sup>。まず、Bioassay 社、WIL Research 社、CiToxLAB 社の担当者が開発者である L'Oreal 社で試験法を習得後、それぞれの実験室で週 2 回試験を行い、90%以上の正解があれば成功で、6 週以内に 3 週連続（もしくは 4 週のうち 1 回は失敗）成功が続けば技術移転したとする。

Bioassay 社と WIL Research 社は 2011 年に、CiToxLAB 社は 2013 年に技術移転は問題なく行われた。

##### 4-2. 施設内再現性

2013 年 L'Oreal 社で行われた 3 回施行する Ring trial 2013<sup>10)</sup>では、21 物質が施設内再現性で評価された。そのうち 14 物質は、施設間再現性でも評価された。11 物質が感作性物質、10 物質が非感作性物質の計 21 物質である。結果は、Chlorobenzene 以外の 20 物質で感作性 (S)と非感作性(NS)が一致し、施設内再現性は 95% (APM) であった (表 1)。OPM での施設内再現性も 95%で差はなかった。

表 1 施設内再現性の評価成績

ID	Chemical name	CAS No	GHS potency category	LLNA potency category	LLNA	U-SENS™ Classification		
						Exp1	Exp2	Exp3
11	Lauryl gallate	1166-52-5	1A	Strong	S	S	S	S
17	Methyldibromoglutaronitirile	35691-65-7	1A	Strong	S	S	S	S
21	Diethyl maleate	141-05-9	1B	Moderate	S	S	S	S
35	Phenyl benzoate	93-99-2	1B	Moderate	S	S	S	S
36	tetramethylthiuram disulfide (TMTD)	137-26-8	1B	Moderate	S	S	S	S
63	Benzyl benzoate	120-51-4	1B	Weak	S	S	S	S
89	Salicylic acid	69-72-7	NC	NS	NS	NS	NS	NS
109	4-Nitrobenzyl bromide	100-11-8	1A	Extreme	S	S	S	S
116	m-Phenylenediamine	108-45-2	1A	Strong	S	S	S	S
127	m-Aminophenol	591-27-5	1B	Moderate	S	S	S	S
143	12-Bromo-1-dodecanol	3344-77-2	1B	Moderate	S	S	S	S
152	4-Allylanisole	140-67-0	1B	Weak	S	S	S	S
160	Chlorobenzene	108-90-7	NC	NS	NS	NS	NS	S
165	6-Methylcoumarine	92-48-8	NC	NS	NS	S	S	S
71	Methyl salicylate	119-36-8	NC	NS	NS	NS	NS	NS
72	Vaniline	121-33-5	NC	NS	NS	S	S	S
94	Glycerol	56-81-5	NC	NS	NS	NS	NS	NS
161	Sulfanilic acid	121-57-3	NC	NS	NS	NS	NS	NS
162	4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7	NC	NS	NS	NS	NS	NS
164	1-Bromobutane	109-65-9	NC	NS	NS	NS	NS	NS
173	Citric acid	77-92-9	NC	NS	NS	NS	NS	NS

grey: substances with discordant classification as compared to the other validation laboratories.

2014年にL'Oreal社、WIL Research社、Bioassay社、CiToxLAB社の4社で行われたValidation study 2014<sup>10)</sup>では6つの感作性、9つの非感作性の計15物質を用いて各社3回行い施設内再現性が評価された。L'Oreal社、Bioassay社、WIL Research社は全て一致（施設内再現性：WLR=100%）し、CiToxLAB社は9物質の一致に留まり、WLRは60%であった。4社の平均は90%（APM）であった（表2）。OPMでの4社の平均値は92%であった。

表 2 施設内再現性の評価成績 2

ID	Chemical name	CAS No	GHS potency category	L'Oreal			Bioassay			CiToxLAB			WIL Research		
				NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS
168	Benzoic acid	65-85-0	NC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS
175	Benzyl alcohol	100-51-6	NC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	S	NS	NS	NS
94	Glycerol	56-81-5	NC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
91	Hexane	110-54-3	NC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	NS	NS	NS
93	Lactic acid	50-21-5	NC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	S	NS	NS
174	Polyethylene glycol	25322-68-2	NC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	S	NS	NS	NS
163	Saccharin	81-07-2	NC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
172	Streptomycin sulfate	3810-74-0	NC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	S	NS	NS	NS	NS
167	Vinylidene dichloride	75-35-4	NC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
22	3-Dimethylamino-propylamine	109-55-7	1B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
33	Ethylene diamine	107-15-3	1B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	Methylisothiazolinone	2682-20-4	1A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
58	Methylmethacrylate	80-62-6	1B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
48	Resorcinol	106-46-3	1B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	Toluene diamine sulphate	615-50-9	1A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

grey: substances with discordant classification as compared to the other validation laboratories.

#### 4-3. 施設間再現性

Ring trial 2013 の 14 物質（11 種の感作性物質と 3 種の非感作性物質）に加えて、Validation study 2014 で 24 物質（8 種の感作性物質と 16 種の非感作性物質）を加えた計 38 物質を Bioassay 社、CiToxLAB 社、L'Oreal 社、WIL Research 社の 4 社で判定し、施設間再現性を評価した。

Ring trial 2013 の 14 物質のうち 12 物質の感作性 (S) と非感作性 (NS) が 4 社で一致し、施設間再現性は 86%であった。Validation study 2014 の 24 物質のうち 20 物質が 4 社で一致し、施設間再現性は 83%であった。併せて 38 物質中 32 物質で一致し、施設間再現性は 84% (APM) であった (表 3)。OPM でも 84%であった。

表 3 施設間再現性の評価成績

Study	ID	Substance	CAS	LLNA	L'Oreal	Bioassay	CiToxLAB	WIL Research
	164	1-Bromobutane	109-65-9	NS	NS	NS	NS	NS
V	162	4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7	NS	NS	NS	NS	NS
a	168	Benzoic acid	65-85-0	NS	NS	NS	NS**	NS
l	175	Benzyl alcohol	100-51-6	NS	NS	NS	S*	NS
i	173	Citric acid	77-92-9	NS	NS	NS	NS	NS
d	94	Glycerol	56-81-5	NS	NS	NS	NS	NS
a	91	Hexane	110-54-3	NS	NS	NS	NS**	NS
t	93	Lactic acid	50-21-5	NS	NS	NS	NS**	NS
i	71	Methyl salicylate	119-36-8	NS	NS	NS	NS	NS
o	174	Polyethylene glycol	100-51-6	NS	NS	NS	S*	NS
n	163	Saccharin	81-07-2	NS	NS	NS	NS	NS
	172	Streptomycin sulfate	3810-74-0	NS	NS	NS	S*	NS
s	161	Sulfanilic acid	121-57-3	NS	NS	NS	NS	NS
t	72	Vanillin	121-33-5	NS	S	NS	S	NS
u	167	Vinylidene dichloride	75-35-4	NS	NS	NS	NS	NS
d	88	Xylene	1330-20-7	NS	NS	NS	NS	NS
y	5	1,4-Phenylenediamine	106-50-3	S	S	S	S	S
2	22	3-Dimethylaminopropylamine	109-55-7	S	S	S	S	S
0	40	Cinnamic alcohol	104-54-1	S	S	S	S	S
1	33	Ethylene diamine	107-15-3	S	S	S	S	S
4	7	Methylisothiazolinone	2682-20-4	S	S	S	S	S
	58	Methylmethacrylate	80-62-6	S	S	S	S	S
	48	Resorciol	108-46-3	S	S	S	S	S
	9	Toluene diamine sulphate	615-50-9	S	S	S	S	S
R	165	6-Methyl coumarine	92-48-8	NS	S	NS	S	S*
i	160	Chlorobenzene	109-90-7	NS	NS**	NS	S	NS
n	89	Salicylic acid	69-72-7	NS	NS	NS	NS	NS
g	152	4-Allylanisole	140-67-0	S	S	S	S	S
	109	4-Nitrobenzyl bromide	100-11-8	S	S	S	S	S
s	143	12-Bromo-1-dodecanol	3344-77-2	S	S	S	S	S
t	63	Benzyl benzoate	12-51-4	S	S	S	S	S
u	21	Diethyl maleate	141-05-9	S	S	S	S	S
d	11	Lauryl galate	1166-52-5	S	S	S	S	S
y	127	m-Aminophenol	591-27-5	S	S	S	S	S
2	116	m-Phenylenedimine	108-45-2	S	S	S	S	S
0	17	Methyldibromo glutaronitrile	35691-65-7	S	S	S	S	S
1	35	Phenyl benzoate	93-99-2	S	S	S*	S	S
3	36	Tetramethylyhiuram disulphate	137-26-8	S	S	S	S	S

grey: substances with discordant classification as compared to the other validation laboratories.

\*two 'S' classification and one 'NS'; \*\*two 'NS' classification and one 'S'.

## 5. 正確度（および感度と特異度）<sup>1\*</sup>

Validation study 2014 の 24 物質の結果を LLNA の結果（Xylene は偽陽性となったが、ヒトでの評価は陰性のため最終的に陰性とした）を元に正確度を出した。8 つの感作性物質は 4 社とも陽性となり感度は 100%であった<sup>10)</sup>。特異度は CiToxLAB 社が 81%で最も低く WIL Research 社と Bioassay 社が 100%であった。正確度は CiToxLAB 社で 88%、L'Oreal 社で 96%、WIL Research 社と Bioassay 社で 100%だった。4 社平均では、感度 100%、特異度 94%、正確度 96%だった。

施設間再現性で用いた Ring trial 2013 と Validation study 2014 を合わせた 38 物質の結果を LLNA データを参考に分析して正確度を出している（APM）。CiToxLAB 社と L'Oreal 社は 19 の感作性物質は全て陽性と判定され、感度は 100%であった。特異度は CiToxLAB 社が最も低く 68%、Bioassay 社が最も高く 100%であった。正確度は CiToxLAB 社で 87%、L'Oreal 社は 95%、WIL Research 社と Bioassay 社は 97%であった。4 社平均では、感度 99%、特異度 88%、正確度 93%であった<sup>10)</sup>。4 社平均を OPM で評価した場合は、感度 98%、特異度 90%、正確度 93%であった。

本法の感度及び特異度の正確度を分析するため、175 物質を L'Oreal 社が評価している<sup>11)</sup>。以下全て APM による評価結果を示す。175 物質はヒトまたはモルモットの LLNA のデータが有る物質で、*in vitro* 試験でも評価可能な物質である。70%は化粧品関連で、そのうち香料が 29%、保存剤が 15%、染料が 6%であった。175 物質中 65%が Aptula and Roberts (2006)の 5 つのタンパク結合様式（Michael acceptor, Schiff base formation, acyl transfer agent, SN2 (substitution nucleophilic bi-molecular)または SNAr (nucleophilic aromatic substitution)) の少なくとも一つに属していた<sup>12)</sup>。

理想的にはヒトのデータを参考とすべきであるが、LLNA の EC3 とヒトの感作性との間に良い相関が見られるため、LLNA が *in vitro* 皮膚感作性試験の評価のための基礎となっている。175 物質中 166 物質に LLNA のデータがあり、101 物質はヒトのデータが、そして 92 物質は LLNA とヒトの両方のデータがあった（図 2）。LLNA のデータがある 166 物質についての検討では、LLNA の結果に対して、感度 91%、特異度 65%、正確度 86%であった。

ヒトのカテゴリ 1 から 4（Basketter ら (2014)<sup>13)</sup>）の明らかな感作性物質の U-SENS<sup>TM</sup> の感度は 100%であった<sup>9)</sup>。101 物質のヒトのデータに対しては、U-SENS<sup>TM</sup> は感度 100%、特異度 47%、正確度 77%であった。LLNA しかデータが無い 74 物質に対しては、感度 91%、特異度 76%、正確度 88%であった。

ヒトのデータがある場合は、まずヒトのデータから、Basketter ら (2014)<sup>13)</sup>のカテゴリ 1 から 4 までを感作性物質とし、クラス 5 と 6 を非感作性物質として判定した。ヒトのデータが無い場合は LLNA から判定した。結果は、感度 96%、特異度 55%、正確度 82%であった<sup>9)</sup>。

U-SENS<sup>TM</sup> と同じく第三段階のイベントである、樹状細胞が活性化する際の細胞表面分子

---

<sup>1\*</sup>値は、文献 9)は最新の予測モデル（APM）を用いているが、10)は旧予測モデル（OPM）を用いている。

の発現亢進を利用した *in vitro* 試験法である h-CLAT との比較を行った。対象物質は、L'Oreal 社が評価した 175 物質<sup>9)</sup>のうち LLNA のデータがある 166 物質 (APM による評価) と、h-CLAT の評価化合物 142 物質 (すべて LLNA データあり)<sup>14)</sup>の共通の化合物 (104 物質) とした。この 104 物質について、LLNA に対する U-SENS<sup>TM</sup> の予測性は、感度 93%、特異度 61%、正確度 86%であり、h-CLAT の予測性は、感度 90%、特異度 68%、正確度 85%であった。したがってこの 2つの試験法の LLNA に対する予測性は概ね同様と判断された。

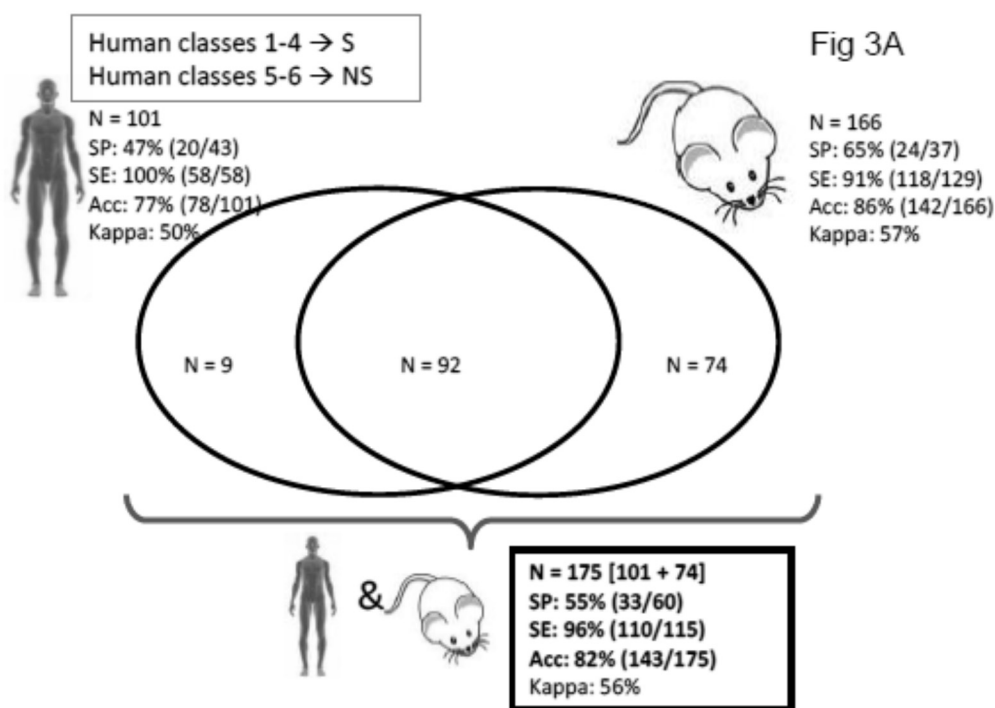


図2 U-SENS<sup>TM</sup>の正確度のために用いた 175 物質のヒトと LLNA によるデータ (引用文献 9) より)

## 6. 評価可能な物質の範囲

L'Oreal 社が評価した 175 物質では、表 4 に示す通り、様々な化学物質の皮膚感作性の予測が可能であることが示されている<sup>9)</sup>。なお、Ethyl vanillin (No. 169)、Polyethylene glycol (No. 174)、Benzyl alcohol (No. 175)の 3 物質は、OPM では陰性と判定されていたが<sup>11)</sup>、表 4 に示すように APM では陽性と判定された。

表 4 Database of 175 chemicals used in the evaluation of the predictive performance of the U-SENS™ assay

N°	Substance	CAS number	Human potency cat. <sup>a</sup>	LLNA <sup>b</sup>			U-SENS				Human versus LLNA / U-SENS <sup>d</sup>
				EC3 (%)	Potency cat. <sup>c</sup>	CLP cat.	Vehicle	Class	EC150 (µg/mL)	CV70 (µg/mL)	
1	Tetrachlorosalicylanilide	1154-59-2	1	0.04	Extreme	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	2	2	✓
2	2,4-Dinitrochlorobenzen DNCB	97-00-7	1	0.05	Extreme	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	1	1	✓
3	Diphenyl cyclopropenone	886-38-4	1	0.05	Extreme	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	0.2	1.4	✓
4	Potassium dichromate	7778-50-9	1	0.08	Extreme	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	0.9	0.9	✓
5	1,4-Phenylenediamine	106-50-3	1	0.11	Strong	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	2	21	✓
6	Dimethyl fumarate	624-49-7	1	0.35	Strong	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	1	27	✓
7	Methylisothiazolinone (MI pure)	2682-20-4	1	0.4	Strong	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	1	6	✓
8	Glutaraldehyde (act. 50%)	111-30-8	2	0.1	Strong	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	83	>200	✓
9	Toluene diamine sulphate	615-50-9	2	0.2	Strong	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	2	12	✓
10	Gold chloride	13453-07-1	2	0.3	Strong	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	0.1	0.1	✓
11	Lauryl gallate	1166-52-5	2	0.3	Strong	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	0.7	0.7	✓
12	Propyl gallate	121-79-9	2	0.32	Strong	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	2	33	✓
13	2-Nitro-1,4-phenylenediamine	5307-14-2	2	0.4	Strong	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	5	115	✓
14	2-aminophenol	95-55-6	2	0.4	Strong	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	0.1	8	✓
15	Formaldehyde (act. 37%)	50-00-0	2	0.4	Strong	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	6	6	✓
16	Methyl heptine carbonate	111-12-6	2	0.5	Strong	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	39	70	✓
17	Methyl dibromo glutaronitrile	35691-65-7	2	0.9	Strong	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	3	6	✓
18	Isoeugenol	97-54-1	2	1.2	Moderate	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	45	115	✓
19	Glyoxal (act. 40%)	107-22-2	2	1.4	Moderate	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	33	93	✓
20	Cinnamic aldehyde	104-55-2	2	2	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	1	8	✓
21	Diethyl maleate	141-05-9	2	2.1	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	7	30	✓
22	3-Dimethylaminopropylamine	109-55-7	2	2.2	Moderate	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	103	>200	✓
23	1,2-Benzisothiazolin-3-one	2634-33-5	2	2.3	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	0.4	3	✓
24	Thioglycerol	96-27-5	2	3.6	Moderate	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	88	>200	✓
25	Lyr al	31906-04-4	2	17.1	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	6	24	✓
26	Metol	55-55-0	3	0.8	Strong	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	0.3	3	✓
27	1,4-Dihydroquinone	123-31-9	3	0.11	Strong	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	1	6	✓
28	Chlorpromazine	50-53-3	3	0.14	Strong	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	6	6	✓
29	Benzoyl peroxide	94-36-0	3	0.3	Strong	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	27	33	✓
30	Hydroxyethyl acrylate	868-77-9	3	1.4	Moderate	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	40	>200	✓
31	Bisphenol A-diglycidyl ether	1675-54-3	3	1.5	Moderate	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	10	26	✓
32	2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	3	1.7	Moderate	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	40	80	✓
33	Ethylene diamine	107-15-3	3	2.2	Moderate	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	16	58	✓
34	Farnesol	4602-84-0	3	4.8	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	8	34	✓
35	Phenyl benzoate	93-99-2	3	5.2	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	101	>200	✓
36	Tetramethylthiuramdisulfide	137-26-8	3	6	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	0.1	3	✓
37	Citral	5392-40-5	3	13	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	4	13	✓
38	Eugenol	97-53-0	3	13	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	29	142	✓
39	Abietic acid	514-10-3	3	15	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	37	66	✓
40	Cinnamic alcohol	104-54-1	3	21	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	21	110	✓
41	Imidazolidinyl urea	39236-46-9	3	24	Weak	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	11	28	✓
42	Coumarin	91-64-5	3	30	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	152	>200	✓
43	Butyl glycidyl ether	2426-08-6	3	31	Weak	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	149	>200	✓
44	Chlorhexidine gluconate	55-56-1	4	na	na	na	DMSO	POSITIVE	4	4	✓
45	Bronopol	52-51-7	4	na	na	na	RPMI	POSITIVE	2	6	✓
46	Hexyl salicylate	6259-76-3	4	0.18	Strong	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	27	27	✓
47	Iodopropyl butylcarbamate	55406-53-6	4	0.87	Strong	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	2	4	✓
48	Resorcinol	108-46-3	4	5.5	Moderate	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	5	173	✓
49	Amyl cinnamic aldehyde	122-40-7	4	11	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	13	27	✓
50	Lillial	80-54-6	4	19	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	9	34	✓
51	Hydroxycitronellal	107-75-5	4	20	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	6	9	✓
52	Benzocaine	94-09-7	4	22	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	103	>200	✓
53	Amylcinnamyl alcohol	101-85-9	4	25	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	15	40	✓
54	Geraniol	106-24-1	4	26	Weak	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	54	134	✓
55	Linalool	78-70-6	4	30	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	41	>200	✓
56	Ethylhexyl diethylacrylate	97-90-5	4	35	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	81	>200	✓
57	Aniline	62-53-3	4	89	Weak	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	63	>200	✓
58	Methylmethacrylate	80-62-6	4	90	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	157	>200	✓
59	Anethole	104-46-1	5	2.3	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	>200	>200	✓
60	Benzyl salicylate	118-58-1	5	2.9	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	66	66	✓

61	Anisyl alcohol	105-13-5	5	5.9	Moderate	Cat. 1B	DMSO	NEGATIVE	>200	>200	M
62	Hexyl cinnamic aldehyde	101-86-0	5	8	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	5	22	✓
63	Benzyl benzoate	120-51-4	5	17	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	>200	>200	✓
64	Pentachlorophenol	87-86-5	5	20	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	21	21	✓
65	Benzaldehyde	100-52-7	5	25	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	85	175	✓
66	Diethanolamine	111-42-2	5	40	Weak	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	27	>200	✓
67	Isopropyl myristate	110-27-0	5	44	Weak	Cat. 1B	DMSO	NEGATIVE	>200	>200	M
68	Citronellol	106-22-9	5	43.5	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	25	>200	✓
69	Limonene (not oxidised)	138-86-3	5	69	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	26	43	✓
70	Pyridine	110-86-1	5	72	Weak	Cat. 1B	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	M
71	Methyl salicylate	119-36-8	5	NC	NS	no cat.	DMSO	NEGATIVE	>200	>200	L&M
72	Vanillin	121-33-5	5	NC	NS	no cat.	DMSO	POSITIVE	50	>200	L
73	4-Aminobenzoic acid	150-13-0	5	NC	NS	no cat.	DMSO	NEGATIVE	>200	>200	L&M
74	Propyl paraben	94-13-3	5	NC	NS	no cat.	RPMI	POSITIVE	24	122	L
75	Benzalkonium chloride	8001-54-5	5	NC	NS	no cat.	RPMI	POSITIVE	0.1	1	L
76	Hydrocortisone	50-23-7	5	NC	NS	no cat.	DMSO	NEGATIVE	>200	>200	L&M
77	Propylene glycol	57-55-6	5	NC	NS	no cat.	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	L&M
78	Isopropanol	67-63-0	5	NC	NS	no cat.	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	L&M
79	Phenoxy ethanol	122-99-6	5	NC	NS	no cat.	DMSO	POSITIVE	176	>200	L
80	Sorbic acid	110-44-1	5	na	na	na	DMSO	POSITIVE	115	>200	✓
81	Triclosan	3380-34-5	5	na	na	na	DMSO	POSITIVE	4	5	✓
82	Triethanolamine	102-71-6	5	na	na	na	RPMI	POSITIVE	189	>200	✓
83	Butylene glycol	107-88-0	5	na	na	na	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	M
84	Cetrimide	57-09-0	5	na	na	na	RPMI	POSITIVE	0.8	0.8	✓
85	Tocopherol	59-02-9	6	7.4	Moderate	Cat. 1B	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	L
86	Sodium lauryl sulfate	151-21-3	6	14	Weak	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	55	76	L&M
87	DMSO	67-68-5	6	72	Weak	Cat. 1B	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	L
88	Xylene	1330-20-7	6	96	Weak	Cat. 1B	DMSO	NEGATIVE	>200	>200	L
89	Salicylic acid	69-72-7	6	NC	NS	no cat.	DMSO	NEGATIVE	>200	>200	✓
90	Octanoic acid	124-07-2	6	NC	NS	no cat.	RPMI	POSITIVE	70	>200	M
91	Hexane	110-54-3	6	NC	NS	no cat.	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	✓
92	Diethyl phthalate	84-86-2	6	NC	NS	no cat.	DMSO	POSITIVE	121	>200	M
93	Lactic acid	50-21-5	6	NC	NS	no cat.	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	✓
94	Glycerol/Glycerin	56-81-5	6	NC	NS	no cat.	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	✓
95	1-Butanol	71-36-3	6	NC	NS	no cat.	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	✓
96	Tween 80	9005-65-6	6	NC	NS	no cat.	RPMI	POSITIVE	9	200	M
97	Phenol	108-95-2	6	NC	NS	no cat.	DMSO	POSITIVE	22	102	M
98	Dextran	3371-50-4	6	NC	NS	no cat.	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	✓
99	Diethyl toluamide	94271-03-1	6	NC	NS	no cat.	DMSO	POSITIVE	53	>200	M
100	Sorbitol	50-70-4	6	na	na	na	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	✓
101	Glucose	50-99-7	6	na	na	na	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	✓
102	2,4-Dinitrofluorobenzene	70-34-8	na	0.032	Extreme	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	1	4	-
103	Oxazolone	15646-46-5	na	0.003	Extreme	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	145	>200	-
104	MCI/M (act. 1.5%)	55965-84-9	na	0.005	Extreme	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	11	34	-
105	7,12-Dimethylbenz[ <i>a</i> ]anthracene	57-97-6	na	0.006	Extreme	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	47	>200	-
106	p-Benzoquinone	106-51-4	na	0.01	Extreme	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	2	15	-
107	3-Methylcatechol	488-17-5	na	0.02	Extreme	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	0.3	4	-
108	Bandrowski's base	20048-27-5	na	0.04	Extreme	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	1	3	-
109	4-Nitrobenzyl bromide	100-11-8	na	0.05	Extreme	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	0.4	0.4	-
110	Methylnitrosourea	684-93-5	na	0.05	Extreme	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	13	>200	-
111	Cyanuric chloride	108-77-0	na	0.09	Extreme	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	15	68	-
112	p-aminophenol	123-30-8	na	-	Strong	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	2	6	-
113	Phthalic anhydride	85-44-9	na	0.16	Strong	Cat. 1A	DMSO	NEGATIVE	>200	>200	D
114	Benzyl bromide	100-39-0	na	0.2	Strong	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	8	15	-
115	2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid	2508-19-2	na	0.36	Strong	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	10	>200	-
116	3-Phenylenediamine	108-45-2	na	0.49	Strong	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	4	137	-
117	CD3	25646-71-3	na	0.6	Strong	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	1	4	-
118	Squaric acid diethyl ester	5231-87-8	na	0.9	Strong	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	32	71	-
119	1-Phenyl-1,2-propanedione	579-07-7	na	1.3	Moderate	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	35	77	-
120	1-Naphthol	90-15-3	na	1.3	Moderate	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	3	31	-
121	2-Hydroxyethyl acrylate	818-61-1	na	1.4	Moderate	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	2	11	-
122	Nonanoyl chloride	764-85-2	na	1.8	Moderate	Cat. 1A	DMSO	POSITIVE	22	46	-
123	N,N-bis(2-hydroxyethyl)-p-phenylenediamine sulfate	54381-16-7	na	1.04	Moderate	Cat. 1A	RPMI	POSITIVE	8	29	-
124	Methyl-2-nonyl noate	111-80-8	na	2.5	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	18	105	-
125	3,3,5-trimethylhexanoyl chloride	36727-29-4	na	2.7	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	17	48	-
126	Phenylacetaldehyde	122-78-1	na	3	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	7	17	-
127	3-Aminophenol	591-27-5	na	3.2	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	11	128	-
128	diethyl sulfate	64-67-5	na	3.3	Moderate	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	22	>200	-
129	Benzylideneacetone	122-57-6	na	3.7	Moderate	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	3	7	-
130	3-Propylidene-phthalide	17369-59-4	na	3.7	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	29	>200	-

131	Squaric acid	2892-51-5	na	4.3	Moderate	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	63	>200	-
132	α-Methyl cinnamic aldehyde	101-39-3	na	4.5	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	9	>200	-
133	Nickel sulfate	10101-97-0	na	4.8	Moderate	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	16	55	-
134	trans-2-Hexenal	6728-26-3	na	5.5	Moderate	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	4	51	-
135	3,4-Dihydrocoumarin	119-84-6	na	5.6	Moderate	Cat. 1B	DMSO	NEGATIVE	>200	>200	D
136	2-Methoxy-4-methylphenol	93-51-6	na	5.8	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	13	159	-
137	Diethylenetriamine	111-40-0	na	5.8	Moderate	Cat. 1B	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	D
138	1-Bromoeicosane	4276-49-7	na	6.1	Moderate	Cat. 1B	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	D
139	2-Phenylpropionaldehyde	93-53-8	na	6.3	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	4	12	-
140	4-Chloroaniline	106-47-8	na	6.5	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	1	182	-
141	Dihydroeugenol	2785-87-7	na	6.8	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	47	122	-
142	Undec-10-enal	112-45-8	na	6.8	Moderate	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	9	29	-
143	12-Bromo-1-dodecanol	3344-77-2	na	6.9	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	9	28	-
144	Safrol	116-26-7	na	7.5	Moderate	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	12	39	-
145	Methyl methanesulphonate	66-27-3	na	8.1	Moderate	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	2	33	-
146	Tween 21	9005-64-5	na	-	Weak	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	68	>200	-
147	Farnesal	19317-11-4	na	12	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	6	6	-
148	1-Bromohexane	111-25-1	na	10	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	>200	183	-
149	2-Ethylhexyl acrylate	103-11-7	na	10	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	15	200	-
150	2,3-Butanedion	431-03-8	na	11	Weak	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	11	103	-
151	Oxalic acid	144-62-7	na	15	Weak	Cat. 1B	DMSO	NEGATIVE	>200	>200	D
152	4-Allylanisole	140-67-0	na	18	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	98	>200	-
153	Benzyl cinnamate	103-41-3	na	18.4	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	177	>200	-
154	4,4,4-Trifluoro-1-phenylbutane-1,3-dione	326-06-7	na	20	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	18	41	-
155	α-iso-Methylionone	127-51-5	na	21.8	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	22	36	-
156	Cyclamen aldehyde	103-95-7	na	22	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	30	117	-
157	Undecylenic acid	112-38-9	na	25	Weak	Cat. 1B	DMSO	POSITIVE	18	75	-
158	R(+)-Limonene	5989-27-5	na	69	Weak	Cat. 1B	RPMI	POSITIVE	30	>200	-
159	Tartaric acid	87-69-4	na	NC	NS	no cat.	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	-
160	Chlorobenzene	108-90-7	na	NC	NS	no cat.	DMSO	NEGATIVE	>200	>200	-
161	Sulfamic acid	121-57-3	na	NC	NS	no cat.	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	-
162	4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7	na	NC	NS	no cat.	DMSO	NEGATIVE	>200	>200	-
163	Saccharin	81-07-2	na	NC	NS	no cat.	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	-
164	1-Bromobutane	109-65-9	na	NC	NS	no cat.	DMSO	NEGATIVE	>200	>200	-
165	6-Methyl coumarin	92-48-8	na	NC	NS	no cat.	DMSO	POSITIVE	94	187	D
166	Ethyl benzoacetate	94-02-0	na	NC	NS	no cat.	DMSO	NEGATIVE	>200	>200	-
167	Vinylidene dichloride	75-35-4	na	NC	NS	no cat.	DMSO	NEGATIVE	>200	>200	-
168	Benzoic acid	65-85-0	na	NC	NS	no cat.	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	-
169	Ethyl vanillin	121-32-4	na	NC	NS	no cat.	DMSO	POSITIVE	66	66	D
170	Sulfanilamide	63-74-1	na	NC	NS	no cat.	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	-
171	Kanamycin sulfate	25389-94-0	na	NC	NS	no cat.	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	-
172	Streptomycin sulfate	3810-74-0	na	NC	NS	no cat.	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	-
173	Citric acid	77-92-9	na	NC	NS	no cat.	RPMI	NEGATIVE	>200	>200	-
174	Polyethylene glycol	25322-68-3	na	NC	NS	no cat.	RPMI	POSITIVE	73	>200	D
175	Benzyl alcohol	100-51-6	na	NC	NS	no cat.	DMSO	POSITIVE	176	>200	D

<sup>a</sup> Human Skin Sensitizing Potency category (Basketter et al., 2014); na: not available

<sup>b</sup> LLNA (TG429 and EU test method B.42 (OECD, 2010a; UN 2011)); na: not available

<sup>c</sup> LLNA potency category based on the EC3 value as proposed by Kimber et al. (2003).

<sup>d</sup> Human versus LLNA and/or U-SENS™ S/NS classifications: ✓: concordant hazard classifications between human, LLNA and U-SENS™; L: discordant hazard classifications between LLNA and human; M: discordant hazard classifications between U-SENS™ and human; -: concordant hazard classifications between LLNA and U-SENS™ without any human data available; D: discordant hazard classifications between LLNA and U-SENS™ without any human data available.

## 7. 有用性と限界

本法は細胞実験とフローサイトメトリーを組み合わせた試験法であり、細胞培養機器及びフローサイトメーターを保有し、その技術に習熟した施設であれば実施可能と思われる。

また、本法は動物を用いない *in vitro* の手法であり、科学的目的のために実施される動物実験に関し、「動物の愛護及び管理に関する法律」及び3Rの精神と合致している。さらにU-SENS™及びLLNA実施の際に必要な消耗品費は、LLNAでは1アッセイ当たり約10万円であるのに対し、U-SENS™では約1.8万円と試算された。試験期間もLLNAより短期間で実施可能であることから、試験法として迅速性・経済性の面から有用と思われる。

技術的限界として、液相での反応を必要とする試験系であるため、培地に 50 mg/mL、これに所定の濃度で不溶の場合は、DMSO に 50 mg/mL の濃度で溶解あるいは安定的に分散する必要がある（ただし、科学的根拠があれば他の溶媒も使用可能とされている）。

また、本法はフローサイトメーターを用いる手法であり、蛍光を有する物質も評価は可能であるが、FITC や PI と同一波長に強い蛍光を有する物質は測定を妨害する可能性がある。更に、過度の細胞毒性を有する物質は細胞の構造変化を引き起こし正しく評価されない可能性がある。また、他の細胞を用いる試験系と同様に、揮発性物質は飛散による物質のロスや近隣のウェルへのクロスコンタミを起こすため、適切に評価されない可能性がある。

プレハプテン（酸化により活性化される物質）やプロハプテン（P450 等による代謝活性化を必要とする物質）に関しては、これまでの検討では正しく判定された（プレハプテン 4 種及びプロハプテン 7 種、OPM と APM で判定結果は同じ）<sup>11)</sup>。しかし、ウェル中での化学的な酸化の進行については未知であり、また、本細胞の薬物代謝能は限定的であるため、未検討のプロハプテンやプレハプテンについては偽陰性を生じる可能性もある<sup>15)</sup>。

界面活性剤のような細胞膜に影響を与える物質は、CD86 発現の非特異的増大により偽陽性となり得るため、このような物質が陽性と判定された場合は注意が必要である。

また、混合物に関しては、本法の適用例はこれまで 1 例のみであり（OPM と APM で判定結果は同じ）、適用可能性に関する十分な情報は得られていない<sup>11)</sup>。従って、混合物に対する本法の適用については注意が必要である。

本法は、IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment)において他の試験法と組み合わせることにより、感作性物質と非感作性物質との区別を使用することが可能である<sup>16)</sup>。しかし、強度感作性物質（UN GHS 1A 分類）よりも軽度～中等度感作性物質（UN GHS 1B 分類）で偽陰性の判定が生じやすい傾向にあるため、本法単独での感作性強度分類や UN GHS のサブカテゴリー分類への応用には適さない。

## 8. 結論

U-SENS<sup>TM</sup> は、感作性発現機序における第三段階のイベントである樹状細胞が活性化する際の細胞表面分子の発現亢進を利用した *in vitro* 試験法である。ヒト組織球性リンパ腫細胞株である U-937 細胞を用い、活性化に伴い細胞表面での発現量が増加する CD86 を測定する試験法で、化学物質の感作性を判断する上で重要な情報を与えてくれる。

マウスを用いる LLNA の 1/5 程度の消耗品費で実施可能と試算され、試験期間も LLNA に比べ短期間であるため、試験法として迅速性・経済性の面から有用性は高いと思われる。本法は、細胞実験とフローサイトメトリーを組み合わせた試験法であり、細胞培養機器およびフローサイトメーターを保有し、その技術に習熟した施設であれば実施可能と考えられる。なお、細胞の反応性の確認と陽性対照および媒体対照の測定で発生するデータを基にヒストリカルなデータベースを作成・維持し、試験系の再現性を保証するために用いる必要がある。

本試験法のバリデーション試験において、15 物質を用いて実施された施設内再現性は、60～100%であり、平均は 90%であった。OECD 専門家会議における議論で、感作性予測モデルが一部改訂され(APM)、判定の煩雑さが解消された。APM で評価すると、ヒトに対す

る感作性の有無の分類で、Basketter らの報告に基づくヒトのクラス 5 と 6 を感作性無しとした場合、感度 100%、特異度 47%、正確度 77%であったが、クラス 6 のみを感作性無しとした場合は、感度 89%、特異度 65%、正確度 85%であった (101 物質対象)。LLNA のデータがある 166 物質についての検討では、LLNA の結果に対して、感度 91%、特異度 65%、正確度 86%であった。この 166 物質を見る限り、本法は様々な化学物質の皮膚感作性の予測が可能であることが示されている。

U-SENS<sup>TM</sup> で評価した 175 物質と h-CLAT で評価した 142 物質のうち、LLNA のデータがある共通物質は 104 物質であった。この 104 物質について、感度、特異度、正確度を比較したところ、両者での予測性は概ね同様と判断された。

U-SENS<sup>TM</sup> の試験法は、液相での反応を必要とする試験系であるため、培地あるいは DMSO に 50 mg/mL の濃度で溶解あるいは安定的に分散するものであれば試験が可能である。

界面活性剤等の細胞膜の構造変化を引き起こすような物質、測定に使用する FITC や PI と同一波長に強い蛍光を有する物質、揮発性を有する物質などでは、適切に評価されない可能性がある。プレハプテンやプロハプテンに関しては、本法開発の段階では正しく判定されたとしているが、ウェル中での化学的な酸化の進行については未知であり、また、本細胞の薬物代謝能は限定的であるため、未検討のプロハプテンやプレハプテンについては偽陰性を生じる可能性もある。さらに、本法は混合物に関しては適用可能性に関する十分な情報は得られていない、従って、混合物に対する本法の適用については注意が必要である。

本試験法は、強度感作性物質 (UN GHS 1A 分類) に比べて、軽度から中等度感作性物質 (UN GHS 1B 分類) で偽陰性の判定が生じやすい傾向にあるため、本法単独での感作性強度分類や UN GHS のサブカテゴリー分類への利用には適さない。本試験法に用いる細胞の薬物代謝能は限定的であるため、活性化に代謝系を必要とする化学物質では、正しくその感作性が検出されない可能性がある。

本委員会は、上記の本試験法の様々な限界を勘案すると、本試験法単独では皮膚感作性の判定は不十分で有り、証拠の重み付けや他の試験法との組合せで用いることを推奨する。

## 引用文献

- 1) [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects\\_20745788](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788)
- 2) [http://www.reach-serv.com/index.php?option=com\\_content&task=view&id=106&Itemid=115](http://www.reach-serv.com/index.php?option=com_content&task=view&id=106&Itemid=115)
- 3) <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1223/2016-08-12>
- 4) 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 14 EN; doi 10.2787/815737. Available at: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705>
- 5) OECD (2014), The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, OECD Publishing, Paris, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264221444-en>
- 6) Sundström C, Nilsson K (1976), Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer*. 17(5):565-77.
- 7) Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. (1980), Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 26(2):171-6.
- 8) W. Chanput, V. Peters, H. Wichers (2015), THP-1 and U937 Cells, In *The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health*, K. Verhoeckx et al. (eds.), Springer Nature
- 9) EURL ECVAM (2016) Test Submission Template. U-SENS Test Submission Template. European Commission
- 10) 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(1 Pt B):373-82.
- 11) Piroird C, Ovigne JM, 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(5):901-16.
- 12) Aptula and Roberts (2006) Mechanistic applicability domains for nonanimal-based prediction of toxicological end points: general principles and application to reactive toxicity. *Chem Res Toxicol*; 19: 1097-1105.
- 13) Basketter, DA; Alepee, N; Ashikaga, T; Barroso, J; Gilmour, N; Goebel, C; Hibatallah, J; Hoffmann, S; Kern, P; Martinozzi-Teissier, S; Maxwell, G; Reisinger, K; Sakaguchi, H; Schepky, A; Tailhardat, M; Templier (2014) Categorization of Chemicals According to Their Relative Human Skin Sensitizing Potency. *Dermatitis* 25:11-21.
- 14) 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>
- 15) Fabian E, Vogel D, Blatz V, Ramirez T, Kolle S, Eltze T, van Ravenzwaay B, Oesch F, Landsiedel R (2013) Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin

sensitization in vitro. Arch. Toxicol., 87, 1683-1696.

- 16) 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. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata-integrated-approaches-to-testing-and-assessment.htm>