

皮膚感作性試験評価報告書

human Cell Line Activation Test (h-CLAT)

JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会

平成 28 年 9 月 19 日

JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会

委員長 筒井尚久（田辺三菱製薬株式会社）

委員 安達玲子（国立医薬品食品衛生研究所）

金澤由基子（一般財団法人 食品薬品安全センター）

小島幸一（一般財団法人 食品薬品安全センター）

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）

森本隆史（住友化学株式会社）

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 (Quantitative Structure-Activity Relationship: QSAR) モデルや *in vitro* の代替法が推奨されており、動物実験により安全性が評価された成分を含む化粧品の販売が禁止されたことから (2013 年 3 月全面施行)、動物を用いない *in vitro* 試験法の開発が強く望まれている。human Cell Line Activation Test (h-CLAT) 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、ヒト単球系培養細胞である THP-1 細胞を用い、活性化に伴い細胞表面上の発現量が変化する CD86 と CD54 を測定することにより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 h-CLAT について、European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM) により実施されたバリデーション報告書、評価 (ピアレビュー) 報告書およ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。

h-CLAT 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。

h-CLAT では、マウスを用いる Local Lymph Node Assay (LLNA) の 1/5 程度の経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。しかしながら、Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) や ARE-Nrf2 Luciferase Test Method に比べて、操作が煩雑であり、制約が多い。また、陽性対照、陰性対照および媒体対照の測定を継続的に実施し、ヒストリカルなデータベースを作成することが必要とされている。

本試験法の EURL ECVAM によるバリデーション試験において、15 物質を用いて実施された施設内再現性は 73.3~86.7%であり、一般的に高くなかった。ただし、Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) 専門家会議において、試験に使用する THP-1 細胞の前培養条件および被験物質の曝露時間をより厳密に管理することにより、施設内再現性の向上が図れることが示され、OECD 試験法ガイドラインの試験手順にその内容が反映されていることから、施設内再現性の向上が期待できると考える。一方、24 物質を使い 4 施設で実施された施設間再現性は 79.2%であった。

OECD 試験法ガイドラインでは、142 物質の成績から正確度 85%、感度 93%、特異度 66%と記載されているが、log Kow が 3.5 以上で陰性と判定された物質を除いた上での数値である。したがって、特に log Kow が 3.5 以上の物質の場合は偽陰性の可能性を考慮し、補完し得る他の試験より確認しなければならない、本試験法のみで被験物質を皮膚感作性が陰性と判定することはできない。また、特異度が 66%であるため偽陽性と判定することも留意する必要がある。さらに、本試験法に用いる細胞の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、正しくその皮膚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あると考え、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（Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD Test Guideline: TG406）やマウスを用いる局所リンパ節試験（Local Lymph Node Assay(LLNA), OECD TG429）がある。この $[^3\text{H-Methyl}]$ -thymidine 取込量を測定する LLNA 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 TG442A）や Bromodeoxyuridine 量を測定する LLNA: BrdU-ELISA（OECD TG442B）がある。

EU における欧州化学品規制（Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals: REACH）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（Quantitative Structure-Activity Relationship: QSAR）モデルや *in vitro* 等による代替法が推奨されており、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（2013 年 3 月全面施行）。そのため、化学製品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 TG442C）および *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 TG442D）が OECD から試験法ガイドラインとして公表されている。また、これ以外に、単球系細胞の活性化を利用した human Cell Line Activation Test（h-CLAT）、Myeloid U937 Skin Sensitization Test（U-SENS）および 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、EURL ECVAM（the European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing）等においてバリデーション研究が行われてきた。

h-CLAT 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、ヒト単球系培養細胞である THP-1 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 と CD54 を測定する試験法である。h-CLAT のバリデーション研究の結果については、EURL ECVAM による評価（ピアレビュー）が完了し¹⁾、2016 年 7 月に OECD の試験法ガイドラインリストに追加された（TG442E）²⁾。

JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会（以下、委員会）は、h-CLAT 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）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および 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

h-CLAT 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、樹状細胞の活性化時に発現が増大する細胞表面分子の測定である。

樹状細胞の活性化時には、CD86、CD54 のような細胞表面分子の発現量が増大することが知られている。CD86 は、T 細胞に抗原提示する際に T 細胞表面の CD28 と相互作用することにより補助刺激分子として機能する。CD54 は、別名 Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) という接着分子であり、T 細胞表面の Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) と結合する。

h-CLAT では、樹状細胞のモデルとしてヒト単球系培養細胞である THP-1 細胞を用い、化学物質が THP-1 細胞を活性化する能力を評価する。THP-1 細胞に検体である化学物質を添加して 24 時間培養した後、CD86 および CD54 の発現量を、蛍光標識した特異抗体を用いてフローサイトメトリーにより測定する。溶媒のみを添加したコントロールに対する相対蛍光強度を算出し、化学物質による樹状細胞の活性化の指標とする。

3. 試験手順／判定

h-CLAT の試験手順は、用量設定試験と CD86/CD54 発現測定の 2 つに分けられる。

3-1. 細胞調製および試薬

h-CLAT では、THP-1 細胞を使用する。細胞は American Type Culture Collection (ATCC) から入手 (TIB-202™) することが望ましい。

THP-1 細胞は、培養用培地 (RPMI-1620 の基礎培地に 10% Fetal bovine serum, 0.05 mM 2-Mercaptoethanol, 100 unit/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin を加えたもの) にて、 $0.1\sim1.0\times10^6$ cells/mL の細胞濃度で播種し、2~3 日ごとに継代を行い、維持する。細胞濃度は $0.1\sim0.8\times10^6$ cells/mL を維持し、 1.0×10^6 cells/mL を超えないようにする。また、ATCC から入手後の初回融解 2 週間後に、2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB, CAS No.97-00-7、純度 $\geq 99\%$ 以上)、Nickel sulfate (CAS NO. 10101-97-0、純度 $\geq 99\%$ 以上) および陰性対照として Lactic acid (CAS NO. 50-21-5、純度 $\geq 85\%$ 以上) を用いて、反応性の確認を行う。DNCB と Nickel sulfate では、CD86 と CD54 の両方で陽性となり、Lactic acid では、CD86 と CD54 のいずれでも陰性の結果となる。反応性試験で合格した細胞のみを本試験法で用いることができる。THP-1 細胞は、融解後 2 ヶ月まで継代させることができ、継代数が 30 を超えないようにすべきである。

試験実施前に、THP-1 細胞を 0.1 もしくは 0.2×10^6 cells/mL の細胞濃度で培養用フラスコに播種し、それぞれ 72 時間もしくは 48 時間培養する。実験日に、 2×10^6 cells/mL の濃度で

新しい培養用培地に再懸濁した THP-1 細胞懸濁液を 24 穴平底プレートもしくは 96 穴平底プレートに、それぞれ 500 $\mu\text{L}/\text{well}$ もしくは 80 $\mu\text{L}/\text{well}$ で加える。

3-2. 用量設定試験

用量設定試験は、CV75（媒体対照と比較して 75%の細胞生存率を示す被験物質濃度）を決定するために実施する。CV75 は CD86 および CD54 発現量測定濃度設定に利用される。

1) 被験物質および陰性対照の調製

被験物質および陰性対照は、用時調製する。h-CLAT では、被験物質は溶液もしくは安定な懸濁液に調製する。媒体は生理食塩水および基礎培地を第一候補、Dimethyl sulfoxide (DMSO, 純度 $\geq 99\%$ 以上) を第二候補とし、最終濃度は生理食塩水および培地の場合は 100 mg/mL、DMSO の場合は 500 mg/mL とする。100 mg/mL（生理食塩水および培地の場合）および 500 mg/mL（DMSO の場合）の保存溶液を用いて、以下の手順で希釈操作を行う。

－生理食塩水および基礎培地を使用する場合：それぞれの媒体を用いて公比 2 で希釈を行い、8 濃度の保存原液を作製する。これら保存原液はそれぞれ培養用培地でさらに 50 倍に希釈する（使用液）。もし最高濃度である 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で細胞毒性がない場合、最高濃度を上げて細胞毒性試験を再実施して決定するが、プレートにおける最終濃度は、5,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を超えてはいけない。

－DMSO を使用する場合：DMSO を用いて公比 2 で希釈を行い、8 濃度の保存原液を作製する。保存原液はその後、培養用培地でさらに 250 倍に希釈する（使用液）。たとえ細胞毒性がなくとも、プレート中の最終濃度は、1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を超えてはいけない。

媒体対照には、被験物質が生理食塩水または基礎培地で溶液もしくは安定な懸濁液となる場合には培養用培地を用い、被験物質が DMSO で溶液もしくは安定な懸濁液となる場合は DMSO を用いて、そのプレートにおける最終濃度は 0.2%とする。それらは上記の使用液作製の手順と同じ希釈で行う。

2) 被験物質および陰性対照の曝露

1) で調製した被験物質を含む使用液および媒体対照は、細胞懸濁液と 1:1 で混合し（通常、最終濃度の範囲は、7.81~1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、24 穴平底プレートもしくは 96 穴平底プレートにて 37°C、5%CO₂ in air で 24 時間（ ± 0.5 時間）培養する。揮発性の高い被験物質の場合は、ウェル間で被験物質のコンタミが生じる可能性があるので、プレートをシールするなどの処置を施すことが望ましい。

3) Propidium iodide (PI) 染色

24 時間（ ± 0.5 時間）の曝露後、細胞はサンプルチューブに移し、遠心により細胞を集める。上澄みを捨てた後、0.1%ウシ血清アルブミン（Bovine Serum Albumin: BSA）含有リン酸緩衝液 200 μL （96 穴の場合）もしくは 600 μL （24 穴の場合）を加え、再懸濁する。この細胞懸濁液 200 μL は、96 穴の場合 96 穴丸底型プレートに、24 穴の場合はマイクロチュー

ブに移し、96 穴では 200 μ L の 0.1% BSA 含有リン酸緩衝液で、24 穴では 600 μ L の 0.1% BSA 含有リン酸緩衝液 で 2 回以上洗浄する。最終的に、細胞は 0.1% BSA 含有リン酸緩衝液（例えば、400 μ L）で再懸濁し、そこに 20 μ L の PI 溶液（PI の最終濃度は 0.625 μ g/mL）を加える。

4) 細胞毒性の測定と CV75 の算出

PI の取り込みは、フローサイトメーターで分析する。細胞毒性は、10,000 の生細胞（PI ネガティブ）がカウントできる条件で、以下の式により算出する。また、細胞生存率が低い場合には、死細胞数を含む細胞数を 30,000 とした条件にて、細胞生存率（cell viability）を算出する。

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

また、CV75（THP-1 細胞の 75%が生細胞である濃度）は、次式により算出する。

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

a：試験した濃度において生存率 75%を超える最小の生存率

c：試験した濃度において生存率 75%を超えない最大の生存率

b：a となる被験物質濃度

d：c となる被験物質濃度

3-3. CD86 および CD54 発現測定

1) 被験物質、陰性対照および陽性対照の調製

被験物質を溶解もしくは安定な懸濁液とさせる媒体には、生理食塩水、基礎培地および DMSO から適切なものを使用する。被験物質の最高濃度は用量設定試験にて算出された CV75 の 1.2 倍濃度とする。もし、CV75 が求められなかった場合（例えば、用量設定試験で十分な細胞毒性が認められなかった場合）には、被験物質の最大溶解もしくは安定な懸濁濃度を開始濃度とするが、プレートの最終濃度は、生理食塩水もしくは基礎培地では 5,000 μ g/mL、DMSO の場合は 1,000 μ g/mL を超えないようにする。その後、同じ媒体を用いて、公比 1.2 で希釈することで 8 濃度の保存原液（濃度幅：0.335 $\times$ CV75 $\sim$ 1.2 $\times$ CV75：媒体が生理食塩液および基礎培地の場合はこの 100 倍の濃度、DMSO の場合はこの 500 倍の濃度）を作製する。保存原液はその後、培養用培地を用いて、媒体が生理食塩水および基礎培地の場合は 50 倍、媒体が DMSO の場合は 250 倍に希釈し、使用液を作製する。これら使用液は、最終的に細胞懸濁液でさらに 2 倍希釈され、曝露されることとなる。もし結果が、後述する試験成立の条件に合わない時は、正確な CV75 を得るために用量設定試験を再度実施してもよい。CD86 および CD54 発現測定では、24 well のみが使われることに注意する必要がある。

る。

陰性対照/媒体対照は、用量設定試験と同様に調製する。陽性対照には DNCB を使用する。媒体に DMSO を使用し、上段に示すとおり、保存原液を作製する。DNCB は、CD86 および CD54 発現測定陽性対照として、1 濃度（一般的には、プレート中の最終濃度が 4 $\mu\text{g/mL}$ ）が使われる。4 $\mu\text{g/mL}$ とするために、DMSO を媒体にした 2 mg/mL の保存原液を培養用培地で 250 倍に希釈して、8 $\mu\text{g/mL}$ の使用液を作製する。DNCB 濃度に関しては、各施設で決定された CV75 を陽性対照濃度として使用することも可能である。

陽性対照においてもプレートの最終濃度は、生理食塩水もしくは基礎培地では 5,000 $\mu\text{g/mL}$ 、DMSO の場合は 1,000 $\mu\text{g/mL}$ を超えないようにし、陽性対照は 1 濃度であることから後述する被験物質の試験成立の条件のうち、最終項目のみ対象外となる。

2) 被験物質および陰性対照の曝露

被験物質の皮膚感作性の予測結果（陽性もしくは陰性）を得るためには、少なくとも 2 回の CD86 および CD54 発現測定を繰り返す必要がある。2 回の測定は、異なる日もしくは、同日のどちらでも良いが、それぞれの測定で保存原液、被験物質の使用液および染色用抗体溶液は別々に調製されること、使用される細胞塊を分ける（例えば、細胞は異なるフラスコから集めるなど）ことが必要である。しかしながら、細胞は同じ継代数由来でも構わない。使用液として調製した被験物質および陰性対照は、それぞれ細胞懸濁液と 1:1 の割合で混合し、37°C、5%CO₂ in air、24 時間 $\pm$ 0.5 時間、培養する。少なくとも 2 回の測定を実施するので、それぞれの測定では、測定内の被験物質の各濃度および陰性対照は、n=1 であっても問題ない。

3) 細胞の染色および分析

24 時間の曝露後、細胞液をサンプルチューブに移し、遠心により細胞を集め、1 mL の 0.1%BSA 含有リン酸緩衝液（pH 7.4）で 2 回洗浄する。洗浄後、600 μL の 0.1%BSA 含有リン酸緩衝液に 0.01% (w/v) の濃度でグロブリン（Cohn fraction II, III, Human; SIGMA, #2388-10G）を加えたものを加え、4°C で 15 分、インキュベートして、ブロックを行う。その後、細胞は、180 μL ずつ 3 つに等分し、丸底 96 穴プレートもしくはマイクロチューブに移す。

遠心後、細胞は、50 μL の Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 CD86 抗体、FITC 標識抗 CD54 抗体もしくは FITC 標識マウス IgG1 抗体（アイソタイプ）にて、4°C で 30 分間、染色する。h-CLAT DB-ALM プロトコル²⁾に記載されている抗体では、抗 CD86 抗体（BD-PharMingen #555657; Clone:Fun-1）では 3:25 の割合で抗体と 0.1%BSA 含有リン酸緩衝液を混合し、抗 CD54 抗体（DAKO, #F7143; Clone: 6.5B5）および IgG1（DAKO, #X0927）では 3:50 の割合で抗体と 0.1%BSA 含有リン酸緩衝液を混合する。

抗体染色後の細胞は 200 μL の 0.1%BSA 含有リン酸緩衝液で 3 回洗浄後、400 μL の 0.1%BSA 含有リン酸緩衝液で再懸濁し、そこに PI 溶液（PI 濃度が 0.625 $\mu\text{g/mL}$ であれば 20 μL ）もしくはその他の細胞毒性マーカー液を添加する。CD86 および CD54 の発現、細胞生存率はフローサイトメーターを用いて測定する。

3-4 データおよび報告

1) データの評価

CD86 と CD54 の発現は、チャンネル FL-1 を有するフローサイトメーターで測定する。平均蛍光強度（Mean Fluorescence Intensity: MFI）を基に、以下の式から、陽性対照および被験物質で処理した細胞における CD86 および CD54 の相対蛍光強度（Relative Fluorescence Intensity: RFI）を求める。

$$RFI = \frac{\text{MFI of chemical-treated cells} - \text{MFI of chemical-treated isotype control cells}}{\text{MFI of solvent/vehicle-treated cells} - \text{MFI of solvent/vehicle-treated isotype control cells}} \times 100$$

アイソタイプコントロール（マウス IgG1 抗体で染色したもの）の細胞生存率は、3-2 4) の式を用いて計算する。

2) 予測方法

CD86 および CD54 発現測定では、それぞれの被験物質の予測（陽性もしくは陰性）を行うために、少なくとも 2 回の独立した測定を行う必要がある。以下の状況のうち 1 つが 2 回の測定のうち 2 回、もしくは 3 回の測定のうち 2 回で認められた場合、h-CLAT による予測は、陽性と判定する。

- ・細胞生存率 50%以上となるいずれかの濃度において、CD86 の相対蛍光強度が 150%以上となる場合

- ・細胞生存率 50%以上となるいずれかの濃度において、CD54 の相対蛍光強度が 200%以上となる場合

最初の 2 回の測定において、CD86 および/もしくは CD54 がともに陽性であれば、h-CLAT 予測は陽性と判定し、3 回目の測定は不要である。同様に最初の 2 回の測定で、CD86 および CD54 が共に陰性であれば、3 回目の測定は不要で h-CLAT 予測は陰性と判定する。一方、2 回の測定で二つのマーカーのうちいずれも連続して陽性を示さなかった場合、あるいは両者とも連続して陰性とならなかった場合、3 回目の測定が必要で、最終の予測は、3 回の測定の多数結果をもって決定する。

2 回の測定を行い、1 回目は CD86 が陽性、2 回目測定で CD54 が陽性となった場合、3 回目の測定が必要である。その結果、3 回目測定が陰性となった場合、h-CLAT 予測は陰性と判定する。一方、3 回目の測定で、どちらかのマーカー（CD86 もしくは CD54）が陽性、もしくは両マーカーが陽性となった場合、h-CLAT 予測は陽性と判定する。

次ページにフロー図（図 1）を示す。

3-5. 試験成立の条件

h-CLAT の場合、以下の条件が成立する必要がある。

- ・基礎培地対照および媒体対照の細胞生存率が、90%以上である。
- ・媒体対照における CD86 および CD54 の両方の相対蛍光強度値が陽性基準値（CD86 で

は 150%、CD54 では 200%) を超えない。溶媒対照の相対蛍光強度値は、3-4 1)に記載の式により計算される（その際、「MFI of chemical」は「MFI of solvent/vehicle」に、「MFI of solvent/vehicle」は「MFI of (medium) control」に読み換える必要がある。）

・基礎培地対照および媒体対照の両方において、アイソタイプに対する CD86 と CD54 の両方の平均蛍光強度の割合が 105%より大きくなる。

・陽性対照（DNCB）において、細胞生存率が 50%以上を示し、CD86 および CD54 の相対蛍光強度がいずれも陽性基準となる。

・被験物質において、それぞれの測定で試験された少なくとも 4 濃度において、細胞生存率が 50%を超える

最高濃度（ $1.2 \times CV75$ ）での細胞生存率が 90%より小さい場合、陰性結果は受け入れられるが、 $1.2 \times CV75$ の細胞生存率が 90%以上であった場合には、陰性結果は受け入れられない。そのような場合には、再度 CV75 を決定することで、濃度設定をやり直すことが望ましい。ただし、媒体に生理食塩水、基礎培地およびその他の培地を使用した 5,000 $\mu\text{g/mL}$ 、DMSO を使用した 1,000 $\mu\text{g/mL}$ および最大溶解濃度が試験の最高濃度である場合、生存率が 90%以上であっても、陰性結果は許容される。

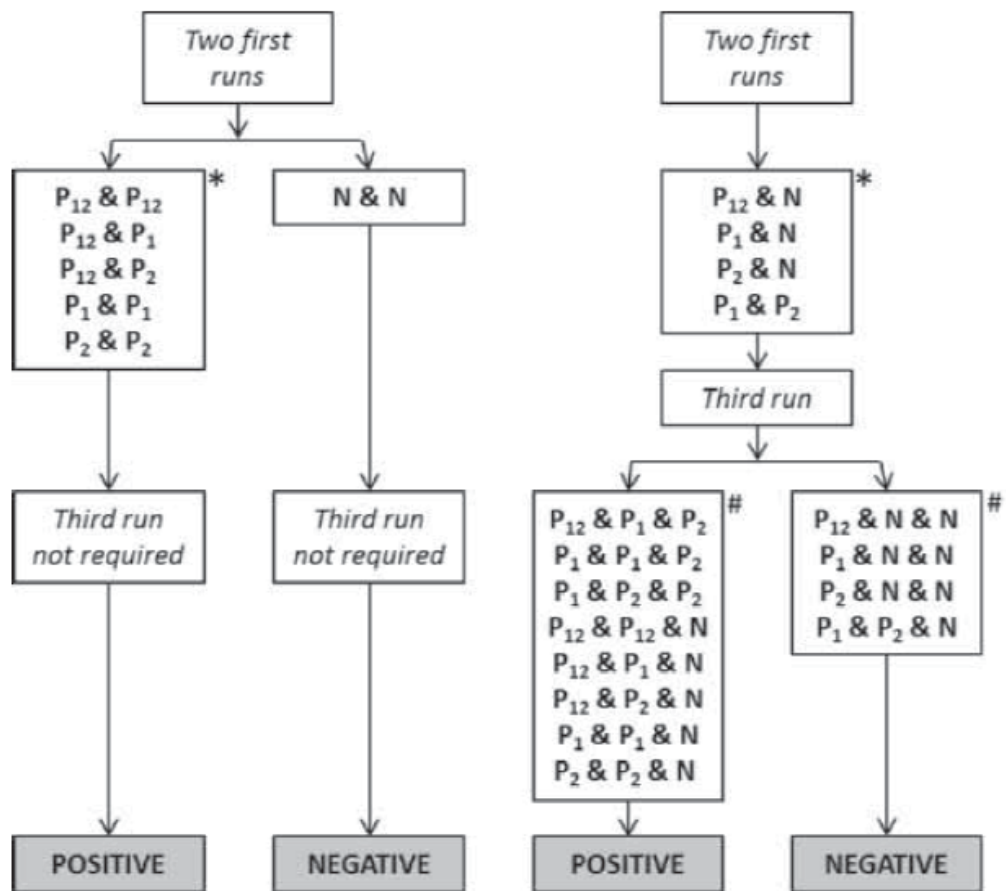


図1 予測方法

P₁ : CD86 のみが陽性の場合、P₂ : CD54 のみが陽性の場合、P₁₂ : CD86 と CD54 がともに陽性の場合、N : CD86 と CD54 がともに陰性の場合、* : 最初の 2 回の測定結果の組み合わせ、# : 最初の 2 回の測定結果に基づいて実施された 3 回目の測定結果の組み合わせ

4. 精度

EURL ECVAM により実施されたバリデーション試験³⁾には 4 施設 (Kao Corporation (主導施設)、Shiseido Quality Assessment Center (主導施設)、EURL ECVAM、Bioassay GmbH) が参加し、技術移転性、施設内再現性および施設間再現性が検討されている。

4-1. 技術移転性

5 物質 (3 感作性物質 : DNCB、Nickel Sulfate、Phenylacetaldehyde および 2 非感作性物質 : Sodium lauryl sulfate、Lactic acid) のデータ取得を行い、主導施設である Kao と Shiseido から EURL ECVAM と Bioassay の 2 施設への技術移転性について評価が行われ、バリデーション報告書では、技術移転性に問題ないと記載されている。

ただし、OECD 試験法ガイドライン⁷⁾では、本法を使用する前に試験施設において技能習熟用 10 物質および陽性対照、陰性対照、媒体対照を用いて反応性を確認し、技術が習熟していることを示すことを求めている。加えて、陽性対照、陰性対照および媒体対照の測定を継続的に実施し、ヒストリカルなデータベースの作成を求めている。

4-2. 施設内再現性 (表 1)

盲検下で評価された 15 物質について、4 施設の施設内再現性 (3 回の繰り返しの試験で同じ結果) は、Kao : 86.7% (一致しなかった物質 : Benzylsalicylate、Methylsalicylate)、Shiseido : 80.0% (一致しなかった物質 : Kathon CG、Beryllium sulfate、Formaldehyde)、Bioassay : 73.3% (一致しなかった物質 : Formaldehyde、Benzylsalicylate、Methylsalicylate、Xylene)、ECVAM : 80.0% (一致しなかった物質 : Chlorpromazine HCl、Benzylcinnamate、Dimethylisophthalate) であった。

表 1 施設内再現性の評価成績

ID	Chemical name	CAS No	GHS potency category	LLNA potency	LLNA	Positive with EC 150 or EC200			
						Kao	Shiseido	Bioassay	ECVAM
10	Kathon CG	26172-55-4	1A	extreme	P	3/3	2/3	3/3	3/3
11	Beryllium sulfate	7787-56-6	1A	extreme	P	0/3	2/3	0/3	3/3
12	Formaldehyde	50-00-0	1A	strong	P	3/3	2/3	2/3	3/3
13	Chloramine T	149358-73-6	1A	strong	P	3/3	3/3	3/3	3/3
14	Chlorpromazine HCl	69-09-0	1A	strong	P	3/3	3/3	3/3	2/3
15	2-mercaptobenzothiazole	149-30-4	1A	moderate	P	3/3	3/3	3/3	3/3
16	Benzylsalicylate	118-58-1	1B	moderate	P	1/3	0/3	1/3	3/3
17	Benzylcinnamate	103-41-3	1B	weak	P	0/3	3/3	0/3	1/3
18	R(+) Limonene	5989-27-5	1B	weak	P	3/3	3/3	3/3	3/3
19	Methylsalicylate	119-36-8	1B	weak	N	2/3	0/3	1/3	3/3
20	Isopropanol	67-63-0	NC	NC	N	0/3	0/3	0/3	0/3
21	Dimethylisophthalate	1459-93-4	NC	NC	N	0/3	0/3	0/3	1/3
22	4-aminobenzoic acid	150-13-0	NC	NC	N	0/3	0/3	0/3	0/3
23	Nickel chloride	7718-54-9	1B	NC (false neg)	N	3/3	3/3	3/3	3/3
24	Xylene	1330-20-7	NC	weak (false pos)	P	0/3	0/3	1/3	3/3
			Number of concordancy			13/15	12/15	11/15	12/15
			Concordancy rate (%)			86.7	80.0	73.3	80.0

本試験では、達成基準を 85% に設定していたが、この基準を上回ったのは 4 施設中 1 施設のみであった。再現性の得られない物質は、UN GHS 1A 分類が 4 物質、1B 分類が 3 物質、分類不可物質が 2 物質の 9 物質であった。また、一つの施設でも偽陰性を示した物質は、UN GHS 1A 分類が 1 物質（Beryllium sulfate）、1B 分類が 3 物質（Benzylsalicylate、Benzylcinnamate、Methylsalicylate）の 4 物質であった。

ただし、OECD 専門家会議において、試験に使用する THP-1 細胞の前培養条件および被験物質の曝露時間をより厳密に管理することにより、施設内再現性の向上が図れることが示され（添付資料）、OECD 試験法ガイドライン⁷⁾の試験手順にその内容が反映されている。

4-3. 施設間再現性（表 2）

盲検下で評価された 24 物質の 4 施設の施設間再現性（4 施設で同じ結果）は 79.2%（一致しなかった物質：Beryllium sulfate、Benzylsalicylate、Benzylcinnamate、Methylsalicylate、Xylene）であり、達成基準 80% を下回った。一致しなかった物質は施設内再現性の試験において一致しなかった 9 物質に含まれる。したがって、施設内再現性と同様に、本法では GHS 1A 分類の物質が適切に判定されない場合のあることが示された。

表 2 施設間再現性の評価成績

ID	Chemical name	CAS No	GHS potency category	LLNA potency	LLNA	Positive with EC 150 or EC200				Between 4 Laboratory Reproducibility
						Kao	Shiseido	Bioassay	ECVAM	
1	Benzoquinone	106-51-4	1A	extreme	P	1/1	1/1	1/1	1/1	Y
2	4-phenylenediamine	106-50-3	1A	strong	P	1/1	1/1	1/1	1/1	Y
3	Dihydroeugenol	2785-87-7	1B	moderate	P	1/1	1/1	1/1	1/1	Y
4	1-thioglycerol	96-27-5	1B	moderate	P	1/1	1/1	1/1	1/1	Y
5	Imidazolidinylurea	39236-46-9	1B	weak	P	1/1	1/1	1/1	1/1	Y
6	Methylmethacrylate	80-62-6	1B	weak	P	0/1	0/1	0/1	0/1	Y
7	Glycerol	56-81-5	NC	NC	N	0/1	0/1	0/1	0/1	Y
8	2,4-dichloronitrobenzene	611-06-3	NC	NC	N	1/1	1/1	1/1	1/1	Y
9	Benzyl alcohol	100-51-6	NC	NC	N	1/1	1/1	1/1	1/1	Y
10	Kathon CG	26172-55-4	1A	extreme	P	3/3	2/3	3/3	3/3	Y
11	Beryllium sulfate	7787-56-6	1A	extreme	P	0/3	2/3	0/3	3/3	N
12	Formaldehyde	50-00-0	1A	strong	P	3/3	2/3	2/3	3/3	Y
13	Chloramine T	149358-73-6	1A	strong	P	3/3	3/3	3/3	3/3	Y
14	Chlorpromazine HCl	69-09-0	1A	strong	P	3/3	3/3	3/3	2/3	Y
15	2-mercaptobenzothiazole	149-30-4	1A	moderate	P	3/3	3/3	3/3	3/3	Y
16	Benzylsalicylate	118-58-1	1B	moderate	P	1/3	0/3	1/3	3/3	N
17	Benzylcinnamate	103-41-3	1B	weak	P	0/3	3/3	0/3	1/3	N
18	R(+) Limonene	5989-27-5	1B	weak	P	3/3	3/3	3/3	3/3	Y
19	Methylsalicylate	119-36-8	1B	weak	N	2/3	0/3	1/3	3/3	N
20	Isopropanol	67-63-0	NC	NC	N	0/3	0/3	0/3	0/3	Y
21	Dimethylisophthalate	1459-93-4	NC	NC	N	0/3	0/3	0/3	1/3	Y
22	4-aminobenzoic acid	150-13-0	NC	NC	N	0/3	0/3	0/3	0/3	Y
23	Nickel chloride	7718-54-9	1B	NC (false neg)	N	3/3	3/3	3/3	3/3	Y
24	Xylene	1330-20-7	NC	weak (false pos)	P	0/3	0/3	1/3	3/3	N
Number of concordancy										19/24
Concordancy rate (%)										79.2

本試験は、2段階で実施されている。1段階目の ID No. 1-9 の物質による試験は1回の実施である。2段階目の ID No. 10-24 の物質を用いた試験は3回実施し、2回あるいは3回同じであった結果を採用している。その結果、n=3 で実施した 15 物質での施設間再現性は 66.7% となり、n=1 での評価を含めた 79.2% を下回る結果となった。これは施設内再現性の試験において、n=3 での繰り返しの際、3 回とも同じ結果を示さないケースが 60 回中 12 回 (20.0%) 含まれることが原因と考えられた。

5. 正確度 (感度および特異度)

EURL ECVAM が 24 物質 (感作性物質 : 非感作性物質 = 16 : 8) で行ったバリデーション試験²⁾では、正確度 76%、感度 81%、特異度 66% であった。この成績は、Ashikaga ら⁴⁾による 100 物質 (感作性物質 : 非感作性物質 = 72 : 28) の成績正確度 84%、感度 88%、特異度 75%) と比較して低いものであった。

Takenouchi ら⁵⁾が水への溶解性が低い物質が偽陰性を示す影響を調べるために実施した 37 物質 (感作性物質 : 非感作性物質 = 30 : 7) の結果では、正確度 68%、感度 70%、特異度 57% であり、30 の感作性物質のうち 9 物質が陰性と判定された。この中の 2 物質は培養液中に沈殿が観察され、5 物質では油滴が観察された。この 9 物質の log Kow は、3.5 以上であった。さらに、Nukada ら⁶⁾による 106 物質 (感作性物質 : 非感作性物質 = 75 : 31) の成績と合わせ合計 143 物質 (感作性物質 : 非感作性物質 = 105 : 38) で検討した結果、正確度は 80%、感度は 83%、特異度は 71% であり、8 物質が偽陰性を示した。このうちの 5 物質は 3.5 未満の log Kow であり、そのうち 2 物質はプロハプテン/プレハプテンであった。また、11 物質が偽陽性を示した。

OECD 試験法ガイドライン⁷⁾には、EURL ECVAM³⁾の 24 物質と、Takenouchi ら⁵⁾の 143 物質の結果を統合し、142 物質 (感作性物質 : 非感作性物質 = 101 : 41) の成績をもとに、正確度、感度、特異度を求め、それぞれ、85%、93%、66% と表記されている。この中で、両報告で重複する 10 物質については EURL ECVAM³⁾のデータを採用し、Takenouchi ら⁵⁾のデータからは、この 10 物質と log Kow が 3.5 以上の 14 物質と混合物 1 種を除く 118 物質のデータを採用している。一方、OECD 試験法ガイドライン⁷⁾の 142 物質に Takenouchi ら⁵⁾の論文の log Kow が 3.5 以上の 14 物質を加えた 156 物質 (感作性物質 : 非感作性物質 = 113 : 43) での正確度、感度、特異度は、それぞれ 83%、68%、79% となり、感度が低下する傾向がみられた。

6. 評価可能な物質の範囲

OECD 試験法ガイドライン⁷⁾に記述のある 142 物質による評価では、表 3 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。

表 3

Chemical Name	LLNA		h-CLAT			Chemical Name	LLNA		h-CLAT		
	Potency Category	EC3 (%)	Results	CD86	CD54		Potency Category	EC3 (%)	Results	CD86	CD54
Benzo(a)pyrene	Extreme	0.0009	P	+	+	2-Ethylhexyl acrylate	Weak	10	P	+	+
Diphenylcyclopropenone	Extreme	0.003	P	-	+	Amyl cinnamic aldehyde	Weak	11	P	-	+
Oxazolone	Extreme	0.003	P	+	-	2,3-Butanedion	Weak	11	P	+	+
Dinitrofluorobenzene	Extreme	0.03	P	+	+	Citral	Weak	13	P	+	+
Tetrachlorosalicylanilide	Extreme	0.04	P	-	+	Eugenol	Weak	13	P	+	+
Bandrowskis base	Extreme	0.04	P	+	+	Ovalic acid	Weak	15	P	+	-
1-Benzoylacetone	Extreme	0.04	P	-	+	Lylal (CAS No. 31906-04-4)	Weak	17	P	+	+
4-Nitrobenzyl bromide	Extreme	0.05	P	+	+	4-Allyl anisole	Weak	18	P	-	+
2,4-Dinitrochlorobenzene	Extreme	0.05	P	+	+	Lilial (CAS No. 80-54-6)	Weak	19	P	-	+
Potassium dichromate	Extreme	0.08	P	+	+	Pentachlorophenol	Weak	20	P	-	+
Beryllium sulfate	Extreme	0.001	N	-	-	Phenyl benzoate	Weak	20	P	+	+
Kathon CG (1.2% CM1)	Extreme	0.009	P	+	+	Cinnamic alcohol	Weak	21	P	+	+
Benzquinone	Extreme	0.0099	P	+	+	α -iso-methylionone	Weak	21.8	P	-	+
Glutaraldehyde	Strong	0.1	P	+	+	Benzocaine	Weak	22	P	+	-
1,4-Dihydroquinone	Strong	0.11	P	+	-	Geraniol	Weak	26	P	+	-
Phthalic anhydride	Strong	0.16	N	-	-	5-Methyl-2,3-hexanedione	Weak	26	P	+	+
Maleic anhydride	Strong	0.16	P	-	+	2,2'-dihydroxyazobenzene	Weak	27.9	P	+	+
Hexyl salicylate	Strong	0.18	P	-	+	Ethylene glycol dimethacrylate	Weak	28	P	-	+
Benzyl bromide	Strong	0.2	P	-	+	Penicillin G	Weak	30	P	-	+
Benzyl peroxide	Strong	0.22	N	-	-	Linalool	Weak	30	P	-	+
Lauryl gallate	Strong	0.3	P	+	+	Butyl glycidyl ether	Weak	31	N	-	-
Propyl gallate	Strong	0.32	P	-	+	Hydroxy citronellal	Weak	33	P	+	+
2-Aminophenol	Strong	0.4	P	+	-	Pyridine	Weak	72	P	+	-
2-Nitro-4-phenylenediamine	Strong	0.5	P	-	+	Aniline	Weak	89	P	+	+
Cobalt chloride	Strong	0.6	P	-	+	Nonanoic acid	Weak	21	P	+	-
Chloramine T (CAS No. 149358-73-6)	Strong	0.6	P	+	+	Benzyl cinnamate	Weak	18.4	N	-	-
CD-3 (CAS No. 25646-71-3)	Strong	0.6	P	+	+	Imidazolidinylurea	Weak	24	P	+	+
Iodopropynyl butylcarbamate	Strong	0.9	P	-	+	R(+)-Limonene	Weak	69	P	-	+
1,2-Dibromo-2,4-dicyanobutane	Strong	0.9	P	+	+	Methylmethacrylate	Weak	90	N	-	-
Chlorpromazine HCl	Strong	0.14	P	-	+	Furil (CAS No. 109-65-9)	Non-sensitizer	ND	P	+	+
4-Phenylenediamine	Strong	0.11	P	+	-	1-Butanol	Non-sensitizer	ND	N	-	-
Chloramine T (CAS No. 127-65-1)	Strong	0.4	P	+	+	1-Iodoheptane	Non-sensitizer	ND	P	+	-
Formaldehyde	Strong	0.61	P	+	+	2-Acetyl cyclohexanone	Non-sensitizer	ND	P	-	+
Isoeugenol	Moderate	1.2	N	-	-	2-Hydroxypropyl methacrylate	Non-sensitizer	ND	N	-	-
1-Naphthol	Moderate	1.3	P	+	+	4-Hydroxybenzoic acid	Non-sensitizer	ND	N	-	-
1-Phenyl-1,2-propanedione	Moderate	1.3	P	+	+	6-Methylcoumarin	Non-sensitizer	ND	N	-	-
2-Hydroxyethyl acrylate	Moderate	1.4	P	+	+	Acetanilide	Non-sensitizer	ND	N	-	-
Glyoxal	Moderate	1.4	P	-	+	Benzalchonium chloride	Non-sensitizer	ND	N	-	-
Bisphenol A-diglycidyl ether	Moderate	1.5	P	+	+	Benzaldehyde	Non-sensitizer	ND	P	+	+
Vinyl pyridine	Moderate	1.6	P	+	-	Benzoic acid	Non-sensitizer	ND	N	-	-
2-Methyl-2H-isothiazolone	Moderate	1.9	P	+	+	Chlorobenzene	Non-sensitizer	ND	P	+	-
3-Dimethylaminopropylamine	Moderate	2.2	P	+	+	Clofibrate	Non-sensitizer	ND	P	-	+
Ethylene diamine	Moderate	2.2	P	+	-	Coumarin	Non-sensitizer	ND	N	-	-
1,2-Benzisothiazoline-3-one	Moderate	2.3	P	-	+	Dextran	Non-sensitizer	ND	N	-	-
Methyl-2-nonyl nate	Moderate	2.5	P	+	-	Diethylphthalate	Non-sensitizer	ND	P	-	+
Phenylacetaldehyde	Moderate	3.0	P	+	+	Dimethyl formamide	Non-sensitizer	ND	N	-	-
Cinnamic aldehyde	Moderate	3.0	P	+	+	Ethyl benzoate	Non-sensitizer	ND	N	-	-
3-Aminophenol	Moderate	3.2	P	-	+	Ethyl vanillin	Non-sensitizer	ND	N	-	-
Diethyl sulphate	Moderate	3.3	P	+	+	Furil (CAS No. 492-94-4)	Non-sensitizer	ND	N	-	-
3-Propylenephthalide	Moderate	3.7	P	+	+	Kanamycin	Non-sensitizer	ND	N	-	-
Benzylidene acetone	Moderate	3.7	P	+	+	Lactic acid	Non-sensitizer	ND	N	-	-
2,4-Heptadienal	Moderate	4.0	P	+	+	Octanoic acid	Non-sensitizer	ND	P	-	+
5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	Moderate	4.4	P	-	+	Propyl paraben	Non-sensitizer	ND	P	+	+
Alpha-methyl cinnamic aldehyde	Moderate	4.5	P	+	+	Propylene glycol	Non-sensitizer	ND	N	-	-
Nickel sulfate	Moderate	4.8	P	+	+	Saccharin	Non-sensitizer	ND	N	-	-
Tetramethylthiuramdisulfide	Moderate	5.2	P	+	+	Salicylic acid	Non-sensitizer	ND	P	-	+
Trans-2-hexenal	Moderate	5.5	P	+	+	Streptomycin sulfate	Non-sensitizer	ND	N	-	-
Resorcinol	Moderate	5.5	P	-	+	Sulfanilamide	Non-sensitizer	ND	N	-	-
3,4-Dihydrocoumarin	Moderate	5.6	P	-	+	Tween 80	Non-sensitizer	ND	N	-	-
Diethyl maleate	Moderate	5.8	P	+	-	Vanillin	Non-sensitizer	ND	N	-	-
2-Methoxy-4-methyl-phenol	Moderate	5.8	P	+	+	Zinc sulfate	Non-sensitizer	ND	P	-	+
Diethylenetriamine	Moderate	5.8	N	-	-	Glycerol	Non-sensitizer	ND	N	-	-
2-Phenylpropionaldehyde	Moderate	6.3	P	+	+	2,4-Dichloronitrobenzene	Non-sensitizer	ND	P	+	+
4-Chloroaniline	Moderate	6.5	P	+	-	Benzyl alcohol	Non-sensitizer	ND	P	+	-
β -damascone	Moderate	6.7	P	+	+	Methylsalicylate	Non-sensitizer	ND	P	-	+
Perillaaldehyde	Moderate	8.1	P	+	-	Isopropanol	Non-sensitizer	ND	N	-	-
Trimellitic anhydride	Moderate	9.2	P	+	-	Dimethyl isophthalate	Non-sensitizer	ND	N	-	-
2-Mercaptobenzothiazole	Moderate	1.7	P	-	+	4-Aminobenzoic acid	Non-sensitizer	ND	N	-	-
Benzylsalicylate	Moderate	2.9	N	-	-	Sodium lauryl sulfate	Others	14	N	-	-
1-Thioglycerol	Moderate	3.6	P	+	-	Nickel chloride	Others	ND	P	+	+
Dihydroeugenol	Moderate	6.8	P	+	+	Xylene	Others	95.8	N	-	-

: Takenouchiらの論文 (2013) からの引用

: h-CLAT Validation Study Report(2012)からの引用

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」および 3R の精神と合致している。さらに h-CLAT および 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、h-CLAT では約 2 万円であり 1/5 程度の経費で実施可能と試算された。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、生理食塩液あるいは培地に 100 mg/mL、これらに所定の濃度で不溶の場合は、DMSO に 500 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り、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。

物性に関する適用限界としては log Kow が 3.5 を超える物質は偽陰性を生じやすい傾向にあるが、該当物質による陽性の結果はある程度信頼できることが報告されている。

本細胞の代謝能は限定的であるため、プロハプテン（P450 等による代謝活性化を必要とする物質）やプレハプテン（酸化により活性化される物質）は偽陰性を生じる可能性がある。

バリデーション試験で評価した金属塩では United Nations (UN) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) 1A に分類される Beryllium sulfate が、偽陰性となったが、既報⁴⁾によると Potassium dichromate、Cobalt chloride、Nickel sulfate は正しく評価されているため、金属塩を適用範囲外とする根拠はない。

本法による偽陰性の判定は、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）で生じやすい傾向にある。これらの結果から、陽性と判定された場合は感作性陽性と判断することは可能と考えるが、1 割程度は偽陽性の可能性があることに留意する必要がある。

また、本法は技術的には混合物にも応用可能とされているが、混合物での実験例は極めて限られている。

従って、現時点では以下の物質群への適用性は明確でないと考える。

- －試験溶媒に溶解しない物質および試験溶媒中で不安定な物質
- －プロハプテン、プレハプテン
- －揮発性物質
- －FITC や PI と同じ波長域に強い蛍光を有する物質

なお、バリデーション試験の成績からは、本法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と考えられる。

8. 結論

h-CLAT 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。

マウスを用いる LLNA の 1/5 程度の経費で実施可能と試算され、試験期間も LLNA に比べ短期であるため、有用性は高いと思われる。しかしながら、細胞密度と培養時間を厳守すること、公比 1.2 の濃度設定が必要なため、DPRA や ARE-Nrf2 Luciferase Test Method に比べて、操作が煩雑であり、制約が多い。また、陽性対照、陰性対照および媒体対照の測定を継続的に実施し、ヒストリカルなデータベースを作成することが必要とされている。

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、73.3～86.7%であり、全般的に高くなかった。ただし、OECD 専門家会議において、試験に使用する THP-1 細胞の前培養条件および被験物質の曝露時間をより厳密に管理することにより、施設内再現性の向上が図れることが示され、OECD 試験法ガイドラインの試験手順にその内容が反映されていることから、施設内再現性の向上が期待できると考える。一方、24 物質を用いて実施された施設間再現性は、79.2%であった。

OECD 試験法ガイドラインでは、142 物質の成績から正確度 85%、感度 93%、特異度 66%と記載されているが、log Kow が 3.5 以上で陰性と判定された物質を除いた上での数値である。また、OECD 試験法ガイドラインの 142 物質に log Kow が 3.5 以上の 14 物質を加えた 156 物質の正確度、感度、特異度は、それぞれ 83%、68%、79%となり、感度が低下する傾向がみられた。したがって、特に log Kow が 3.5 以上の物質の場合は偽陰性の可能性を考慮し、補完し得る他の試験より確認しなければならず、本試験法のみで皮膚感作性を陰性と判定することはできないと考える。また、特異度が 66%であるため偽陽性と判定することもある必要がある。

さらに、UNGHS 分類の物質で、軽度感作性物質では偽陰性が生じやすく、強度感作性物質ではその比率は低い。このことから、本試験法は、物質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と考える。また、本試験法に用いる細胞の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. EURL ECVAM (2015) Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitization testing. Accessible at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/news/news_docs/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-
2. DB-ALM (INVITTOX) (2014) Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Accessible at: <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/search/h-clat>
3. EURL ECVAM (2013) human Cell Line Activation Teat (h-CLAT) Validation Study Report. Accessible at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/news/news_docs/h-clat-validation-study-report
4. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010) A comparative evaluation of in vitro skin sensitization tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.*, 38, 275-284.
5. Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013) Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic chemicals with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.*, 38, 599-609.
6. 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.
7. OECD (2016) OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E: *In Vitro* Skin Sensitization: human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Available at: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-in-vitro-skin-sensitisation_9789264264359-en

2015.10.14

Supplemental explanation for the h-CLAT draft guideline

Kao and Shiseido

Potential Source of Variability in h-CLAT

1. Variability on cell seeding conditions in pre-culture
2. Variability on exposure time of test chemicals
3. Technical proficiency for laboratories that are not experienced with the h-CLAT

2

Cell Seeding Condition in Pre-culture

➤ Original pre-culture condition

Seeded at a density between
 0.1×10^6 and 0.2×10^6 cells/mL



48 or 72 hours

Collect cells from culture flask,
 Prepare cell suspension at 2×10^6 cells/mL for the assay

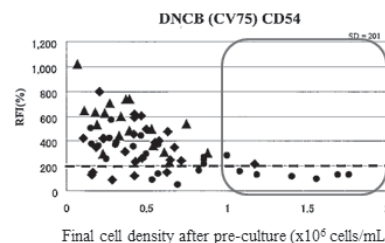
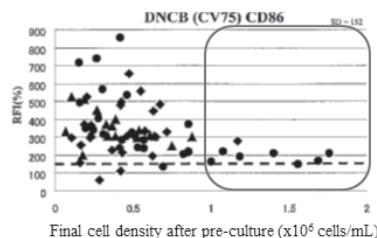
➤ Potential variability

- In general, cell density may affect the state of cell differentiation, which, in turn, could be a source of variability in cell-based assays.
- In the h-CLAT, the cell density in the culture flask after pre-culture may affect the variability of CD86/CD54 expression induced by allergens (Mizuno et al, 2008).

3

Cell Seeding Condition in Pre-culture

➤ Effect on final cell density in culture flask after pre-culture (Mizuno et al., 2008, AATEX)

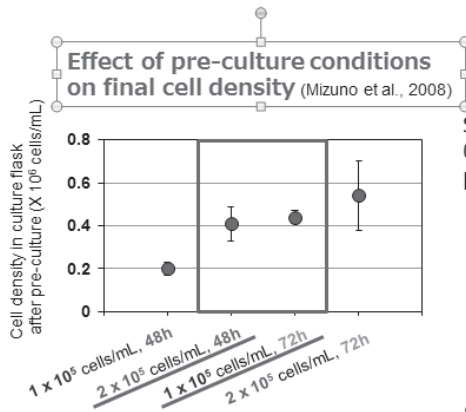


- CD86/CD54 expression levels induced by sensitizer are changed depending on the final cell density just after pre-culture.
- These results indicated that cell density should not exceed 1.0×10^6 cells/mL. (→ Already mentioned in the SOP)
- Variability of cell seeding condition in pre-culture could be a source of variability of h-CLAT.

4

Solution to Cell Seeding Condition in Pre-culture

To ensure high consistency within and between laboratories in the pre-culturing of THP-1 cells before testing



Seeded at a density between 0.1×10^6 and 0.2×10^6 cells/mL and pre-cultured for 48 or 72 hours



Seeded at a density of either 0.1×10^6 or 0.2×10^6 cells/mL, and pre-cultured for 72 or 48 hours, respectively

5

Solution to Cell Seeding Condition in Pre-culture

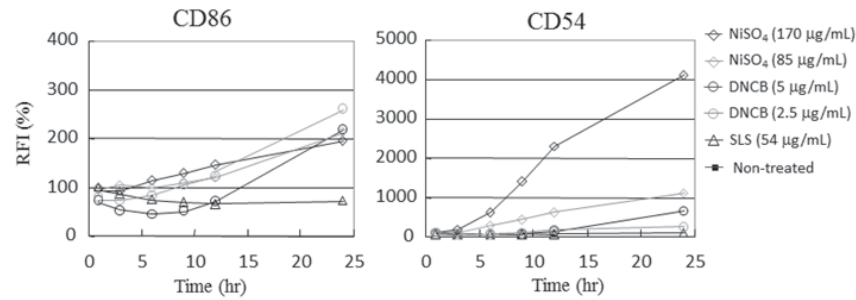
Revised pre-culture condition;

“For testing, THP-1 cells are seeded at a density of either 0.1×10^6 cells/mL or 0.2×10^6 cells/mL, and pre-cultured in culture flasks for 72 or 48 hours, respectively. It is important that the cell density in the culture flask just after the pre-culture period be as consistent as possible in each experiment (by using one of the two pre-culture conditions described above), because the cell density in the culture flask just after pre-culture could affect the variability of CD86/CD54 expression induced by allergens (26).”

6

Variability on Exposure Time of Test Chemicals

- Time-dependency of CD86/54 expression induced by sensitizers (Miyazawa et al., 2008, *J. Toxicol. Sci.*, Ashikaga et al., 2006, TIV)



- CD86/CD54 expression induced by a sensitizer would be changed depending on the exposure time.
- Exposure time of test chemicals as **24±0.5 hours** should be strictly controlled.

