

新規試験法提案書

皮膚感作性試験代替法
Interleukin-8 Reporter Gene Assay
(IL-8 Luc assay)

令和2年12月

国立医薬品食品衛生研究所

新規試験法提案書

令和 2 年 12 月 2 日

No. 2020-02

皮膚感作性試験代替法 Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay) に関する提案

令和 2 年 6 月 25 日に国立医薬品食品衛生研究所にて開催された新規試験法評価会議(通称：JaCVAM 評価会議)において以下の提案がなされた。

提案内容： 本試験法において陽性の結果が得られた場合、皮膚感作性物質と判定することは可能であるが、感作性の強度を分類することは困難である。また、陰性の結果が得られた場合、非皮膚感作性物質と判定できない。したがって本試験法単独での皮膚感作性の判定は不十分であり、被験物質の特性を十分に理解した上で、IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment) を構成するその他の情報と組み合わせて適切に評価することが必要である。なお、本試験法の利用にあたっては、適用範囲および判定不可物質の判断に十分に配慮した上で使用されるべきである。

この提案書は、皮膚感作性試験資料編纂委員会によりまとめられた文書を用いて、JaCVAM 評価会議が評価および検討した結果、その有用性が確認されたことから作成された。

以上の理由により、行政当局の安全性評価方法として皮膚感作性試験代替法 IL-8 Luc assay の使用を提案するものである。

大野泰雄 

大野泰雄

JaCVAM 評価会議 議長

平林容子 

平林容子

JaCVAM 運営委員会 委員長

JaCVAM 評価会議

- 大野 泰雄 (公益財団法人 木原記念横浜生命科学振興財団) : 座長
五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)
池田 孝則 (日本製薬工業協会) **
石井 雄二 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
稲若 邦文 (日本化学工業協会)
井上 智彰 (日本免疫毒性学会) *
今井 教安 (日本動物実験代替法学会)
岩瀬裕美子 (日本製薬工業協会) *
久保 文宏 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) *
中村るりこ (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
西川 秋佳 (国立医薬品食品衛生研究所 病理部/済生会宇都宮病院)
西村 次平 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
沼澤 聡 (日本毒性学会)
平林 容子 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
廣田 衛彦 (日本化粧品工業連合会)
増村 健一 (日本環境変異原学会)
山本 恵子 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) **
横関 博雄 (日本皮膚免疫アレルギー学会)

任期：平成 30 年 4 月 1 日～令和 2 年 9 月 30 日

*：平成 30 年 4 月 1 日～令和 2 年 3 月 31 日

**：令和 2 年 4 月 1 日～令和 2 年 9 月 30 日

JaCVAM 運営委員会

- 平林容子 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター) : 委員長
- 石井孝司 (国立感染症研究所)
- 小川久美子 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部)
- 諫田泰成 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部)
- 北嶋 聡 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部)
- 合田幸広 (国立医薬品食品衛生研究所)
- 佐々木正広 (厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課 化学物質安全対策室)
- 杉山圭一 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 変異遺伝部)
- 高橋祐次 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 動物管理室)
- 高畑正浩 (厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課)
- 東野正明 (厚生労働省 医薬・生活衛生局 医薬品審査管理課 化学物質安全対策室)
- 広瀬明彦 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 安全性予測評価部)
- 笛木 修 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
- 横田雅彦 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
- 足利太可雄 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 安全性予測評価部
第二室) : 事務局
- 小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 安全性予測評価部
第二室) : 事務局

**JaCVAM statement on
the Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay)
Skin Sensitization Test Method**

At a meeting held on 25 June, 2020, at the National Institute of Health Sciences (NIHS) in Kanagawa, Japan, the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) Regulatory Acceptance Board unanimously endorsed the following statement:

Proposal: Although it is possible to classify chemicals that yield positive results using this IL-8 Luc assay test method as skin sensitizers, it is difficult to classify accurately their skin sensitization strength. If a negative result is obtained, it is not possible to judge as a non-skin sensitizer. Therefore, the IL-8 Luc assay test method is not suitable for predicting skin sensitization potential on its own; in order to make a suitable assessment, the results of IL-8 Luc assay testing must be used with a thorough understanding of the properties of each test chemical in combination with other information as part of an integrated approach to testing and assessment (IATA). Furthermore, when using this test, thorough consideration must be given to the applicability domain and to the judgement of inconclusive chemicals.

This statement was prepared, following the review prepared by the Skin Sensitization Test JaCVAM Editorial Committee, to acknowledge that the results of a review and study by the JaCVAM Regulatory Acceptance Board have confirmed the usefulness of this assay.

Based on the above, we propose the IL-8 Luc assay test method as a useful means for estimating skin sensitization by regulatory agencies.

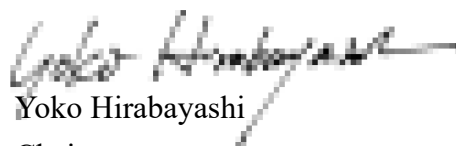
Yasuo Ohno
Chairperson

JaCVAM Regulatory Acceptance Board



Yoko Hirabayashi
Chairperson

JaCVAM Steering Committee



December 2, 2020

The JaCVAM Regulatory Acceptance Board was established by the JaCVAM Steering Committee, and is composed of nominees from the industry and academia.

This statement was endorsed by the following members of the JaCVAM Regulatory Acceptance Board:

Mr. Yasuo Ohno (Kihara Memorial Yokohama Foundation for the Advancement of Life Sciences): Chairperson

Ms. Yoko Hirabayashi (Center for Biological Safety and Research: CBSR, National Institute of Health Sciences: NIHS)

Mr. Morihiko Hirota (Japan Cosmetic Industry Association)

Mr. Yoshiaki Ikarashi (NIHS)

Mr. Takanori Ikeda (Japan Pharmaceutical Manufacturers Association)**

Mr. Noriyasu Imai (Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments)

Mr. Kunifumi Inawaka (Japan Chemical Industry Association)

Mr. Tomoaki Inoue (Japanese Society of Immunotoxicology) *

Mr. Yuji Ishii (CBSR, NIHS)

Ms. Yumiko Iwase (Japan Pharmaceutical Manufacturers Association)*

Mr. Fumihiko Kubo (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)*

Mr. Kenichi Masumura (Japanese Environmental Mutagen Society)

Ms. Ruriko Nakamura (National Institute of Technology and Evaluation)

Mr. Akiyoshi Nishikawa (CBSR, NIHS/ Saiseikai Utsunomiya Hospital)

Mr. Jihei Nishimura (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)

Mr. Satoshi Numazawa (Japanese Society of Toxicology)

Ms. Keiko Yamamoto (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)**

Mr. Hiroo Yokozeki (Japanese Society for Cutaneous Immunology and Allergy)

Term: From 1st April 2018 to 30th September 2020

*: From 1st April 2018 to 31st March 2020

** : From 1st April 2020 to 30th September 2020

This statement was endorsed by the following members of the JaCVAM steering Committee after receiving the report from JaCVAM Regulatory Acceptance Board:

Ms. Yoko Hirabayashi (CBSR, NIHS): Chairperson
Mr. Osamu Fueki (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)
Mr. Yukihiro Goda (NIHS)
Mr. Akihiko Hirose (Division of Risk Assessment, CBSR, NIHS)
Mr. Koji Ishii (National Institute of Infectious Diseases)
Mr. Yasunari Kanda (Division of Pharmacology, CBSR, NIHS)
Mr. Satoshi Kitajima (Division of Toxicology, CBSR, NIHS)
Ms. Kumiko Ogawa (Division of Pathology, CBSR, NIHS)
Mr. Masahiro Sasaki (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Mr. Keiichi Sugiyama (Division of Genetics and Mutagenesis, CBSR, NIHS)
Mr. Masahiro Takahata (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Mr. Yuhji Taquahashi (Animal Management Section of the Division of Toxicology, CBSR, NIHS)
Mr. Masaaki Tsukano (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Mr. Masahiko Yokota (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)
Mr. Takao Ashikaga (Division of Risk Assessment, CBSR, NIHS): Secretary
Mr. Hajime Kojima (Division of Risk Assessment, CBSR, NIHS): Secretary

皮膚感作性試験代替法
Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay)

目 次

評価会議報告書	1
評価報告書	7
OECD KEY EVENT BASED TEST GUIDELINE 442E, IN VITRO SKIN SENSITISATION ASSAYS ADDRESSING THE KEY EVENT ON ACTIVATION OF DENDRITIC CELLS ON THE ADVERSE OUTCOME PATHWAY FOR SKIN SENSITISATION.....	37

評価会議報告書

皮膚感作性試験代替法

Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay)

JaCVAM 評価会議

令和2年(2020年)6月25日

JaCVAM 評価会議

- 大野 泰雄 (公益財団法人 木原記念横浜生命科学振興財団) : 座長
五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)
池田 孝則 (日本製薬工業協会) **
石井 雄二 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
稲若 邦文 (日本化学工業協会)
井上 智彰 (日本免疫毒性学会) *
今井 教安 (日本動物実験代替法学会)
岩瀬裕美子 (日本製薬工業協会) *
久保 文宏 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) *
中村るりこ (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
西川 秋佳 (国立医薬品食品衛生研究所 病理部/済生会宇都宮病院)
西村 次平 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
沼澤 聡 (日本毒性学会)
平林 容子 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
廣田 衛彦 (日本化粧品工業連合会)
増村 健一 (日本環境変異原学会)
山本 恵子 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) **
横関 博雄 (日本皮膚免疫アレルギー学会)

任期：平成30年4月1日～令和2年9月30日

*：平成30年4月1日～令和2年3月31日

**：令和2年4月1日～令和2年9月30日

Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay) は、化学物質の皮膚感作性を予測する試験法である。本試験法は感作性発現の Key event のひとつである、樹状細胞が活性化される際の IL-8 の発現亢進を指標として利用し、ヒト単球系培養細胞株に 2 種のレポーター遺伝子を導入した THP-G8 細胞の IL-8 遺伝子の発現量の変化を測定することによって皮膚感作性の有無を判定する¹⁾。本試験法については、International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM) 等の支援のもと、Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) の主導によってバリデーション研究が実施され²⁾、第三者評価³⁾が行われたのち、2018 年 6 月に経済協力開発機構 (Organization for Economic Co-operation and Development: OECD) 試験法ガイドライン (Test Guideline: TG) 442E の ANNEX III として追記された⁴⁾。JaCVAM 評価会議は、皮膚感作性試験資料編纂委員会により作成された皮膚感作性試験評価報告書 IL-8 Luc assay⁵⁾ を基に本試験法の妥当性について検討した。

1. 試験法の定義

名称：Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay)

代替する対象毒性試験：モルモットを用いる皮膚感作性試験 (OECD TG406) およびマウスを用いる局所リンパ節試験 [LLNA (OECD TG429)、LLNA:DA (OECD TG442A)、LLNA:BrdU-ELISA or -FCM (OECD TG442B)]

試験法の概略：本試験法では、樹状細胞のモデルとしてヒト単球系培養細胞株である THP-1 細胞にルシフェラーゼレポーター遺伝子として IL-8 プロモーターで制御される Stable luciferase orange (SLO) 遺伝子と Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) プロモーターで制御される Stable luciferase red (SLR) 遺伝子を導入した THP-G8 細胞を用い、被験物質を添加して培養後、SLO (λ max = 580 nm) および SLR (λ max = 630 nm) の発光をそれぞれに対応したフィルターを装備したルミノメーターで分別測定し、増加した IL-8 プロモーター活性の程度により感作性の有無を判定する⁶⁾。なお、SLR 遺伝子の発現量は細胞生存率の評価に加え、SLO 発現量の補正に利用する。

2. 評価に用いた資料および評価内容の科学的妥当性

本試験法は、皮膚感作性発現機序における重要なステップである抗原提示細胞の活性化を、その際に認められる IL-8 の発現上昇をもって測定するという点で、科学的に妥当である。感作成立には局所における好中球の動員が必須であり、IL-8 は代表的な好中球走化性因子であることが報告されている⁷⁾。また、IL-8 遺伝子のプロモーター配列に結合する転写因子 Nuclear Factor κ B は種々の免疫系細胞の分化・活性化や炎症応答を制御するメディエーターとして知られ、IL-8 等のサイトカイン分泌制御の他、樹状細胞の活性化に関与することも知られている⁸⁾。

本試験法は、ICATM 等の支援による JaCVAM によるバリデーション研究とそれに続く第三者評価により、皮膚感作性ハザードを予測する試験の実施と評価のための戦略的統合方式 (Integrated Approach to Testing and Assessment: IATA) の一部として受け入れられるべきと報告されており^{2,3)}、2018 年 6 月に OECD TG に追記されている⁴⁾。JaCVAM 皮膚感

作性試験資料編纂委員会では、現在までに公開されている情報を基に本試験法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評価し、ICATM 等の支援による第三者評価結果³⁾と同様に、証拠の重み付けや他の試験法との組み合わせで用いることを推奨している⁴⁾。

3. 本試験法の有用性と適用限界

本試験法は、細胞株を用いる *in vitro* 試験法であり、動物実験における 3Rs の精神に合致している。試験に用いる THP-G8 細胞は市販されているが、株式会社ジーピーシー研究所と譲渡契約を締結する必要がある。アッセイは簡便で、抗体染色の操作がなく 16 時間で終了する。

本試験は液相での反応を必要とするため、被験物質が試験溶液調製用の媒体 X-VIVO™ 15 に 20 mg/mL の濃度で溶解しないものは陰性反応を示したとしても、そのまま陰性として判定することはできない。よって、こうした物質は判定不可物質として、バリデーション研究では一致性の評価から外している。また試験法の原理上、ルシフェラーゼ活性を阻害する物質は測定を妨害する可能性がある。さらに本試験法では、酸無水物では偽陰性率が高く、界面活性剤は偽陽性となることが多い。以上のことより、こうした物質は本試験法の適用範囲外物質として、バリデーション研究の一致性評価から除外された。

これを踏まえた、OECD TG 442E ANNEX III に記載されているバリデーション研究の結果によると、3 施設における施設内再現性は平均すると 87.7% (14 物質)、施設間再現性は 87.5% (32 物質) であった²⁾。X-VIVO™ 15 を用い、OECD TG 442E ANNEX III 収載の予測モデルで評価した結果、LLNA のデータがある 143 物質について、判定不可の 25 物質を除くと、感度 96% (92/96)、特異度 41% (9/22)、正確度 86% (101/118) であった。また別に、適用範囲外に該当する 7 物質および判定不可の 23 物質を除いた 113 物質についての結果は、感度 96% (92/96)、特異度 53% (9/17)、正確度 89% (101/113) であった²⁾。

また本試験法において、プロハプテンおよびプレハプテンは適用範囲外ではないが、感作性発現に酸化や細胞による代謝が必要なこうした物質は偽陰性を生じる可能性がある。さらに陰性反応を示した物質の場合、判定不可物質に該当するかどうかは目視確認での溶媒への溶解性の判断に依存するため、注意が必要である。

4. 目的とする物質又は製品の毒性を評価する試験法としての、社会的受け入れ性および行政上の利用の可能性

社会的受け入れ性：

本試験法は、細胞培養の技術と本試験に対応したフィルターを装備したルミノメーターがあれば容易に実施可能である。

本試験法の実施に必要な THP-G8 細胞は市販されており、試験実施に必要な消耗品費は h-CLAT や U-SENS™ とほぼ同程度である（ただし細胞購入の費用は別）。本試験法は、生きた動物を用いないという点で 3Rs の精神に合致しており、社会的受け入れ性は高い。

行政上の利用性：

本試験法において陽性の結果が得られた場合、皮膚感作性物質と判定することは可能であるが、感作性の強度を分類することは困難である。また、陰性の結果が得られた場合、非皮膚感作性物質と判定できない。したがって本試験法単独での皮膚感作性の判定は不十分であり、被験物質の特性を十分に理解した上で、IATAを構成するその他の情報と組み合わせて適切に評価することが必要である。なお、本試験法の利用にあたっては、適用範囲および判定不可物質の判断に十分に配慮した上で使用されるべきである。

参考文献（最終アクセス日：2020年8月17日）

- 1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, Aiba S. (2011) An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci.* Dec;124:359-69.
- 2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No. 267, ENV/JM/MONO (2017)19. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- 3) Report of the peer review panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) assay for in vitro skin sensitization. Series on testing and assessment. No.268 ENV/JM/MONO(2017)20. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- 4) OECD TG442E (2018) In vitro skin sensitization assays addressing the key event on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitisation. Accessible at: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788
- 5) JaCVAM 皮膚感作性資料編纂委員会：皮膚感作性試験報告書 Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay) (2019年11月1日)
- 6) Kimura Y, Watanabe M, Suzuki N, Iwaki T, Yamakage K, Saito K, Nakajima Y, Fujimura C, Ohmiya Y, Omori T, Kojima H, Aiba S. (2018) The performance of an in vitro skin sensitisation test, IL-8 Luc assay (OECD442E), and the integrated approach with direct peptide reactive assay (DPRA), *J. Toxicol. Sci.*, 43 (12), 741-749.
- 7) Weber FC1, Németh T, Csepregi JZ, Dudeck A, Roers A, Ozsvári B, Oswald E, Puskás LG, Jakob T, Mócsai A, Martin SF. (2015) Neutrophils are required for both the sensitization and elicitation phase of contact hypersensitivity, *J. Exp. Med.*, 212 (1), 15-22.
- 8) Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. (2017) NF- κ B signaling in inflammation, *Signal Transduct Target Ther.* 2, 17023.

評価報告書

皮膚感作性試験代替法

Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay)

皮膚感作性試験資料編纂委員会

令和元年(2019年)11月1日

皮膚感作性試験資料編纂委員会

小島 幸一（委員長：一般財団法人 食品薬品安全センター）

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）

瀬崎 拓人（三井化学株式会社）

武吉正博（一般財団法人 化学物質評価研究機構）

福山 朋季（麻布大学、(前)一般財団法人 残留農薬研究所）

略語

AOP:	Adverse Outcome Pathway
AP-1:	Activator Protein 1
ARE:	Antioxidant/electrophile Response Element
ARE-Nrf2:	ARE-Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2
BrdU:	5-Bromo-2-deoxyuridine
CRO:	Contract Research Organization
DC:	Dendritic Cell
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
DPRA:	Direct Peptide Reactivity Assay
EU:	European Union
FBS:	Fetal Bovine Serum
GAPDH:	GlycerAldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
IATA:	Integrated Approaches to Testing and Assessment
h-CLAT:	Human Cell Line Activation test
ICATM:	International Cooperation on Alternative Test Methods
IL-8:	Interleukin-8
IL-8 Luc Assay:	Interleukin-8 Reporter Gene Assay
JaCVAM:	Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods
KE:	Key Event
KeratinoSens TM :	The ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSens TM test method
LA:	Lactic acid
LLNA:	Local Lymph Node Assay
LuSens:	The ARE-Nrf2 luciferase LuSens test method
MTA:	Material Transfer Agreement
4-NBB:	4-NitroBenzyl Bromide
NFkB:	Nuclear Factor kB
OECD:	Organisation for Economic Co-operation and Development
QSAR:	Quantitative Structure-Activity Relationship
REACH:	Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals
SLO:	Stable Luciferase Orange
SLR:	Stable Luciferase Red
TG:	Test Guideline
U-SENS TM :	U937 cell line activation Test
UN GHS:	United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals
VMT:	Validation Management Team

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 (REACH) では、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* 試験法による安全性評価が推奨されており、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販売が禁止されたことから、動物を用いない *in vitro* 試験法の開発が強く望まれている。

IL-8 Luc assay 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される際の IL-8 の発現亢進を利用した *in vitro* 試験法であり、東北大学の相場らにより開発された。単球系培養細胞株である THP-1 細胞に 2 種のレポーター遺伝子を導入した THP-G8 細胞を用い、活性化に伴う細胞での IL-8 遺伝子の発現量の変化をルシフェラーゼレポーターアッセイで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。IL-8 Luc assay は、経済協力開発機構 (OECD) 試験法ガイドライン (TG) 442E ANNEX I の h-CLAT と類似の方法であり、同様に類似の方法である U-SENSTM (ANNEX II) と共に、TG 442E の ANNEX III として改定版にこれら 3 種の試験法が記載された。

本報告書は、JaCVAM の主導によって行われたバリデーション研究についてまとめられたバリデーション報告書、ICATM の支援等のもと行われた第三者評価報告書および試験開発者の投稿論文などをもと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。

本試験法は、バリデーション研究実施中に、使用する媒体や予測方法の改善が複数回行われた。これらをもとに作成された TG 442E ANNEX III によれば、14 物質を用いて 3 施設で実施され、施設内再現性の平均は 87.7%であった。また、32 物質を用いて 3 施設で行われた施設間再現性は 87.5%であった。34 物質を用いた 3 施設によるバリデーション研究においては、感度は 75 から 87%、特異度は 90 から 100%、正確度は 79 から 91%であった。

本試験法では、液相での反応系を必要とし、媒体の X-VIVOTM 15 に 20 mg/mL の濃度で溶解せずに陰性と判定された物質では、判定不可となり、溶解しても偽陽性を起こす可能性が高い。

さらに、IL-8 Luc assay は、無水物では偽陰性率が高く、界面活性剤は偽陽性となる可能性がある。細胞毒性を示す界面活性剤系の物質は適用範囲外である。ルシフェラーゼ活性を阻害する物質は測定を妨害する可能性がある。プレハブテンやプロハブテンは、バリデーション研究では多くが正しく判定されたが、IL-8 Luc assay で用いる細胞の代謝能は限定的であるため偽陰性を生じる可能性がある。

以上の結果から、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) で偽陰性を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。なお、本法では 20mg/mL で X-VIVOTM 15 に溶解せず、陰性相当の結果となった場合は判定不可となるが、現行結果からは特に陰性物質で判定不可となる割合が高いことから、陰性結果の判定に重点を置く場合には、注意が必要である。

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り、証拠の重み付けや他の試験法との組み合わ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、 $[^3\text{H-Methyl}]$ -thymidine 取込量を測定する方法以外に、ATP 量を測定する LLNA:DA^{*}(OECD TG 442A)や BrdU 取込量を測定する LLNA: BrdU-ELISA[†] および BrdU-FCM[‡](OECD TG 442B)がある¹⁾。

EU において、REACH では、安全性評価においては QSAR モデルや *in vitro* 試験法の活用が推奨されており²⁾、EU 化粧品規則(EC No 1223/2009)では、動物実験によって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³⁾(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 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 KeratinoSensTM(OECD TG 442D Appendix IA) および LuSens (OECD TG 442D Appendix IB)、単球系培養細胞の活性化を利用した h-CLAT (OECD TG 442E ANNEX I) および U-SENSTM(OECD TG 442E ANNEX II)が OECD から TG として公表されている¹⁾。これら以外に、同じく単球系培養細胞の活性化を利用した皮膚感作性試験の *in vitro* 法である IL-8 Luc assay が提案されて、JaCVAM 等によってバリデーション研究が行われた。

IL-8 Luc assay 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 細胞に 2 種のレポーター遺伝子を導入した THP-G8 細胞を用いて、活性化に伴う IL-8 の発現量の変化をルシフェラーゼレポーターアッセイにより測定する試験法で、東北大学の相場らにより開発された⁴⁾。IL-8 Luc assay のバリデーション研究の結果⁵⁾については、ICATM 等の支援による第三者評価⁶⁾が完了し、2017年10月に OECD の TG に追記された(OECD TG 442E ANNEX III)¹⁾。

JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会(以下、委員会)は、IL-8 Luc assay 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 がまとめた有害性発現経路(AOP)では、化学物質による皮膚感作は次の 4 つの重要な事象(KE)から成るとされている⁷⁾。

KE1: 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

*LLNA:DA とは、リンパ球の増殖反応を adenosine triphosphate (ATP) を指標として定量する LLNA

†LLNA: BrdU-ELISA とは、リンパ球の増殖反応を非放射性標識の 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) 取り込み量を ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) で定量する LLNA

‡LLNA: BrdU-FCM とは、リンパ球の増殖反応を非放射性標識の BrdU 取り込み量を FCM (flow cytometry method) で定量する LLNA

- KE2: ケラチノサイトにおける炎症性応答および ARE-dependent pathway による遺伝子発現
- KE3: 樹状細胞 (DC) 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)
- KE4: リンパ節における T 細胞の増殖

IL-8 Luc assay は IL-8 遺伝子のプロモーターを用いたレポーター遺伝子アッセイであり、親細胞として DC 様細胞への分化能を有する THP-1 細胞を使用している。IL-8 遺伝子のプロモーター領域には NFkB、AP-1 等の応答配列があり、本試験系は DC 様細胞の IL-8 遺伝子プロモーターを介する転写活性化を指標とし、IL-8 の産生を間接的に捉える試験系と解釈できる。

本試験系で使用される THP-G8 細胞の親株である THP-1 細胞において、感作性物質の刺激により IL-8 産生が誘導されることが報告されている⁸⁾。IL-8 は代表的な好中球走化性因子であり、感作成立には局所における好中球の動員が必須であることが報告されていることから⁹⁾、IL-8 は局所への好中球動員によって感作成立に関与しているものと考えられる。また、IL-8 遺伝子のプロモーター配列に存在する NFkB は種々の免疫系細胞の分化・活性化や炎症応答を制御するメディエーターとして知られ、IL-8 等のサイトカイン分泌制御の他、DC の活性化に関与することも知られている¹⁰⁾。

以上のことから、IL-8 Luc assay は感作性 AOP における KE3: 樹状細胞の活性化を検出する試験系と位置づけることができる。

本法で使用される THP-G8 細胞は、h-CLAT で使用される THP-1 細胞に IL-8 プロモーターで制御される SLO 遺伝子と GAPDH プロモーターで制御される SLR 遺伝子を安定的に導入した細胞であり、SLO ($\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$) および SLR ($\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$) の発光をそれぞれに対応したフィルターを装備したルミノメーターで分別測定して感作性の有無を判定する¹¹⁾。二種のルシフェラーゼレポーター遺伝子のうち、GAPDH プロモーターで制御される SLR 遺伝子の発現量は細胞生存率の評価に加え、IL-8 プロモーター依存性 SLO 発現量の補正に利用される。

3. 試験手順／判定

IL-8 Luc assay の試験手順および判定は、被験物質を曝露した IL-8 プロモーターで制御される SLO 遺伝子と GAPDH プロモーターで制御される SLR 遺伝子を安定的に導入した THP-G8 細胞における SLO および SLR 遺伝子の発現量解析によって実施される。

3-1. THP-G8 細胞の準備、試薬および反応性確認試験

本法では、株式会社ジーピーシー研究所 (鳥取) より供給されている THP-G8 細胞を使用する。細胞は、起眠後、継代数として 12 回もしくは 6 週間以内の使用が可能であり、細胞の増殖速度によるが、理論的にはかなりの被験物質の試験が可能と算出される。細胞培養培地としては、RPMI-1640 の基礎培地に牛胎仔血清 (FBS: 終濃度 10%)、Penicillin G (終濃度 100 units/mL)、Streptomycin (終濃度 100 $\mu\text{g/mL}$)、Amphotericin B (終

濃度 0.25 µg/mL)、Puromycin(終濃度 0.15 µg/mL) および G418(CAS:108321-42-2、終濃度 300 µg/mL) を加えたものを使用する。試験開始前には本法における細胞の反応性確認を実施するべきである。反応性の確認は、細胞を起眠後 1～2 週間もしくは 2～4 回の継代後に陽性対照物質である 4-NBB(CAS:100-11-8、純度 99%以上)および陰性対照物質である LA(CAS:50-21-5、純度 85%以上)を用いて行う。4-NBB で陽性反応(Ind-IL8LA が 1.4 以上)、LA で陰性反応(Ind-IL8LA が 1.4 より低い)を示した細胞のみを本実験に使用する。

試験実施前に、THP-G8 を $2 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL の細胞濃度で培養フラスコに播種し、48 時間もしくは 96 時間培養する。試験日に、 1×10^6 cells/mL の濃度で 10%FBS 含有 RPMI-1640(抗生物質は入っていない)に再懸濁した THP-G8 細胞を 96 穴平底黒色プレートに 50 µL ずつ加える(各 well あたりの最終細胞数は 5×10^4 cells/well)。

3-2. 被験物質および対照物質の調製(図 1)

被験物質および対照物質は、試験当日に調製する。IL-8 Luc assay では、被験物質および陽性対照物質の調製媒体として X-VIVO™ 15(Lonza)の使用が推奨されている。ただし X-VIVO™ 15 を用いた場合の再現性を証明するデータが乏しい。また、DMSO と比較した場合、X-VIVO™ 15 の正確度は高いが感度が低い¹⁰⁾ ため、X-VIVO™ 15 の有用性判断には疑問の余地がある。ガイドラインでは、X-VIVO™ 15 以外の媒体(DMSO、水等)や培養液を使用する科学的に妥当な理由が存在する場合は、使用してもよいと記載されている。まず、20 mg の被験物質を 1 mL の X-VIVO™ 15 に溶解または懸濁し(20 mg/mL)、ボルテックスミキサーにて激しく攪拌した後、攪拌機を用いて最大 8 rpm、室温(約 20°C)、30 分間攪拌する。上記工程でも溶解しない場合、被験物質が完全に溶解するか安定した分散状態が得られるまで超音波破碎を行う。被験物質が X-VIVO™ 15 に溶解する場合は、さらに X-VIVO™ 15 で 5 倍希釈したものを Stock solution(4 mg/mL)として以降の試験に使用する。被験物質が X-VIVO™ 15 に溶解しない場合は、攪拌機でさらに 30 分以上攪拌した後、15,000 回転(約 20,000G)で 5 分間遠心分離し、得られた上清を Stock solution として以降の試験に使用する。

初回試験は、細胞毒性および感作性のある濃度を検出するために実施する。Stock solution を X-VIVO™ 15 を用いて公比 2 で段階希釈して得られた 11 濃度を調製する。得られた被験物質調製液を 50 µL/well ずつ、96 穴平底黒色プレートにまかれている細胞に添加する。被験物質が X-VIVO™ 15 に溶解する場合、被験物質の終濃度は 0.002 から 2 mg/mL となる。一方、被験物質が X-VIVO™ 15 に完全に溶解しない場合、被験物質の終濃度は X-VIVO™ 15 に飽和した被験物質質量に依存する。2 回目以降の試験では、1 回目の試験結果を踏まえて、Stock solution を CV05[§] の 4 倍高い濃度とする。初回試験の最高濃度で Inh-GAPLA が 0.05 より低くならなかった場合は、2 回目以降の Stock solution も初回試験と同じ濃度を使用する。

2 回目以降の試験では、Stock solution を X-VIVO™ 15 で 1.5 倍段階希釈する事で調

§ CV05 とは、Inh-GAPLA が 0.05 より低くなる最低濃度

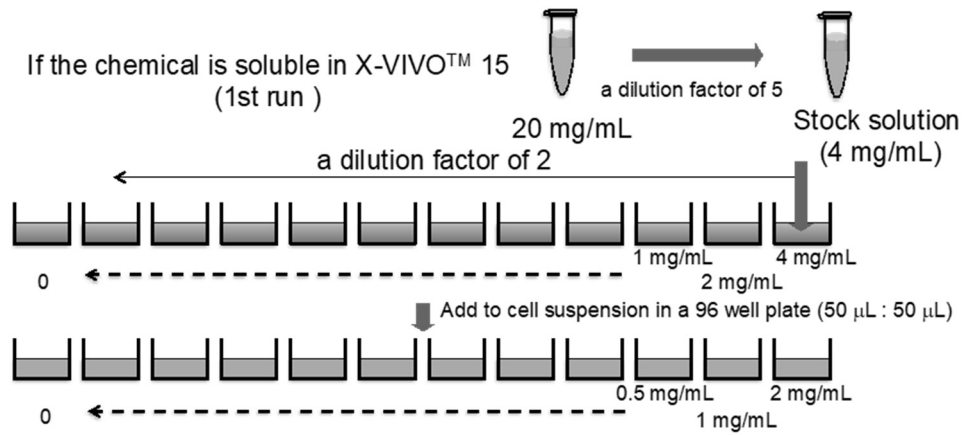
製する。各試験、各濃度とも 4 well ずつ設定する。

4-NBB を推奨陽性対照物質とし、20 mg を 1.5 mL チューブ内で 1 mL の X-VIVO™ 15 と混合し、8 rpm 以下の攪拌機で 30 分以上攪拌した後、15,000 回転(約 20,000G)で 5 分間遠心分離する。得られた上清を以降の試験に使用する。X-VIVO™ 15 を用いて 8 倍希釈および 16 倍希釈し、50 μL の希釈液を同量の THP-G8 細胞とともに 96 穴平底黒色プレートに播種し(4 well/濃度)、攪拌した後 CO₂ インキュベーター内で 16 時間反応させ、ルシフェラーゼ活性を測定する。

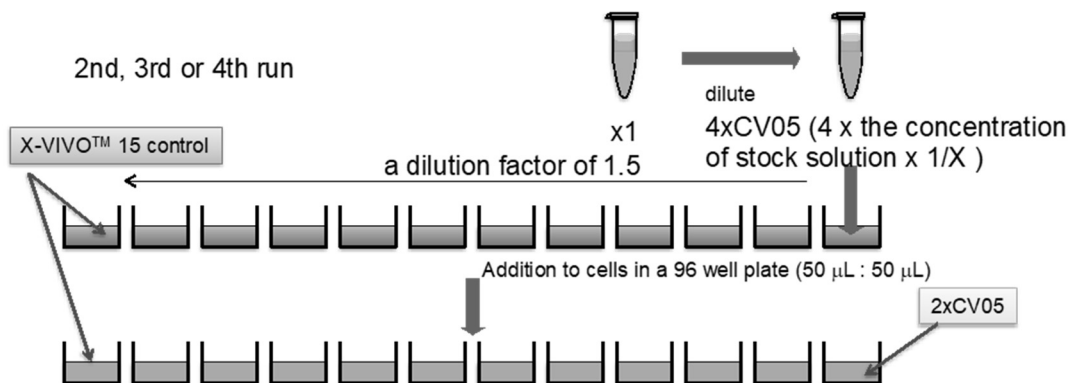
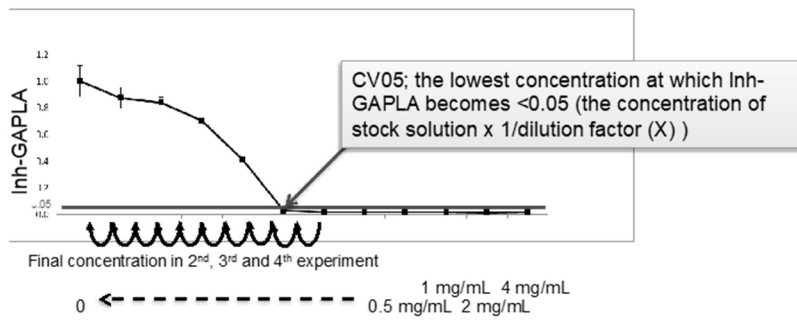
LA を推奨陰性対照物質とし、20 mg を 1.5 mL チューブ内で 1 mL の X-VIVO™ 15 に溶解させる(20 mg/mL)。さらに X-VIVO™ 15 を用いて 10 倍希釈(2 mg/mL) および 20 倍希釈(1 mg/mL)し、50 μL の希釈液を同量の THP-G8 細胞とともに 96 穴平底黒色プレートに播種し(4 well/濃度)、攪拌した後 CO₂ インキュベーター内で 16 時間反応させ、ルシフェラーゼ活性を測定する。

上記対照物質と同等の陽性・陰性反応を証明する背景データがある場合、それらの物質を対照物質として使用しても構わない。ウェル間の被験物質交差汚染を防ぐため、プレートをシールするなどの処置を施す。

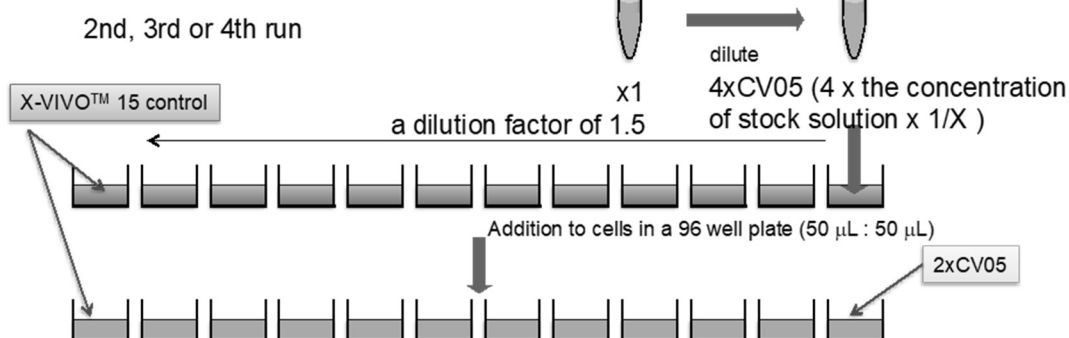
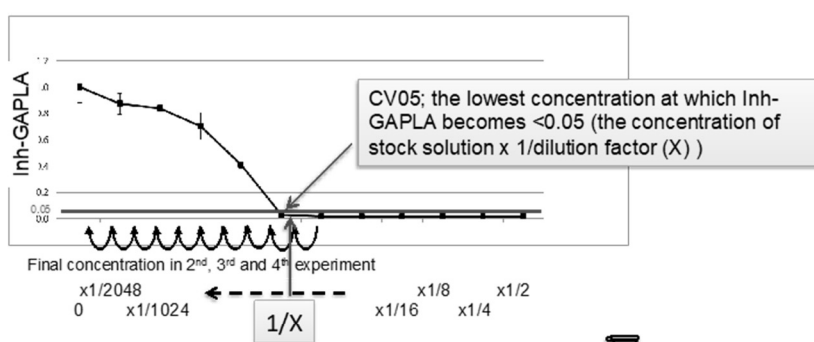
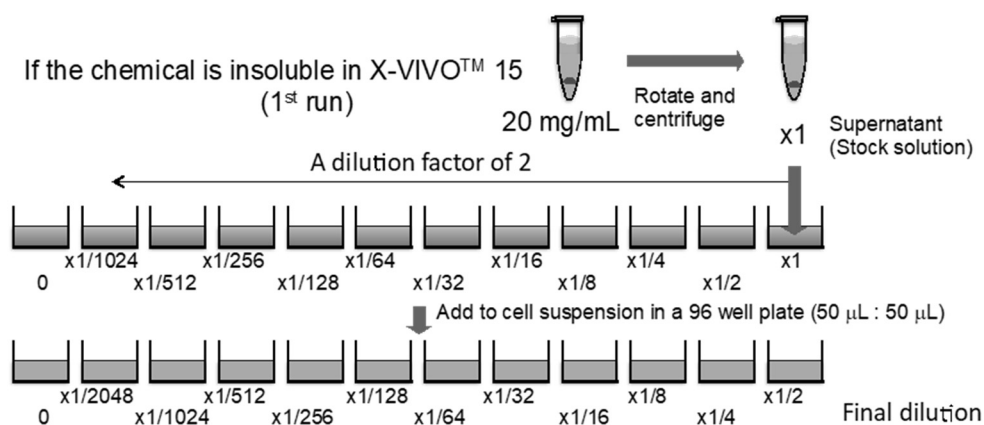
X-VIVO™ 15 に 20mg/mL で溶解する場合



Determine the highest concentration of the following experiments



X-VIVO™ 15 に 20mg/mL で溶解しない場合



The positive control : 4-NBB (insoluble in X-VIVO™ 15)

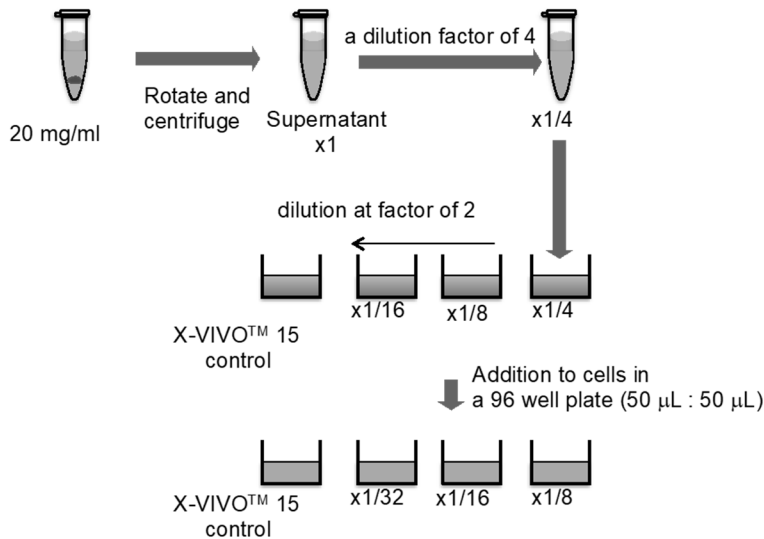


図 1 被験物質および対照物質の調製

3-3. 被験物質および対照物質の曝露

3-2 で調製した被験物質および対照物質を細胞懸濁液と 96 穴平底黒色プレート内にて 1:1 で混合し、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下にて 16 ± 0.5 時間培養する。揮発性の高い被験物質は揮発により他の被験物質曝露区と交差汚染が生じる可能性があるため、その他の被験物質とは別の単独のプレートにて実験を行う。

被験物質ごとに感作性を予測するために 2～4 回の試験を行う。各試験は新たな被験物質調製液および細胞を用いて別日に行う。

3-4. ルシフェラーゼ活性測定

ルシフェラーゼ活性は光学フィルターを備えた 96 穴平底黒色プレート用ルミノメーターを用いて測定する。測定前にルミノメーターの校正および色の識別能を橙色および赤色発光ルシフェラーゼを用いて実施する必要がある。

事前に温められた 100 μL の Tripluc® ルシフェラーゼ測定溶液を被験物質、媒体ないし対照物質を曝露した細胞に添加する。プレートは通常の実験室内環境下(約 20°C)で 10 分間振とうした後、ルミノメーターで測定する。生物発光は各 well 3 秒ずつフィルター存在下(F1)と、非存在下(F0)で測定する。測定結果をもとに下記の項目を算出する。

- IL8LA : 橙色ルシフェラーゼ活性値で、IL-8 プロモーター活性を示す。
- GAPLA : 赤色ルシフェラーゼ活性値で、GAPDH プロモーター活性(細胞生存率および細胞数)を示す。
- nIL8LA : IL8LA を GAPLA で除した値で、細胞生存率もしくは細胞数をノーマライズした後の各曝露区における IL-8 プロモーター活性を示す。
- Ind-IL8LA : 被験物質を曝露した細胞における nIL8LA を無処理細胞の nIL8LA で

除した値で、被験物質曝露により増加した IL-8 プロモーター活性の程度を示す。

- **Inh-GAPLA** : GAPLA の阻害値。被験物質を曝露した細胞における GAPLA を無処理細胞の GAPLA で除した値で、被験物質曝露による細胞毒性の程度を示す。

3-5. データの解析

測定毎に以下の基準で陽性ないし陰性を判断する。

Ind-IL8LA が 1.4 以上で 95%信頼限界の下限が 1.0 以上を示す被験物質を陽性と判断する。一方で、Ind-IL8LA が 1.4 より低い場合か、95%信頼限界の下限が 1.0 より低い場合、もしくはその両方の場合を陰性と判断する。

3-6. 予測方法

4 回の独立した試験において 2 度の陽性反応が認められた場合は感作性陽性と判断する。一方で、4 回の独立した試験において 3 度の陰性反応が認められた場合は感作性陰性と判断する。

表 1 陽性および陰性反応判断の基準

1st run	2nd run	3rd run	4th run	Final prediction
Positive	Positive	-	-	Positive
	Negative	Positive	-	Positive
		Negative	Positive	Positive
		Negative	Negative	Supposed negative
Negative	Positive	Positive	-	Positive
		Negative	Positive	Positive
		Negative	Negative	Supposed negative
	Negative	Positive	Positive	Positive
		Negative	Negative	Supposed negative
		Negative	-	Supposed negative

表 1 で陰性と判断された被験物質で、20 mg/mL 濃度にて X-VIVO™ 15 に溶解した被験物質は図 2 のごとく陰性と判断するが、溶解しない被験物質については判定不可とする。

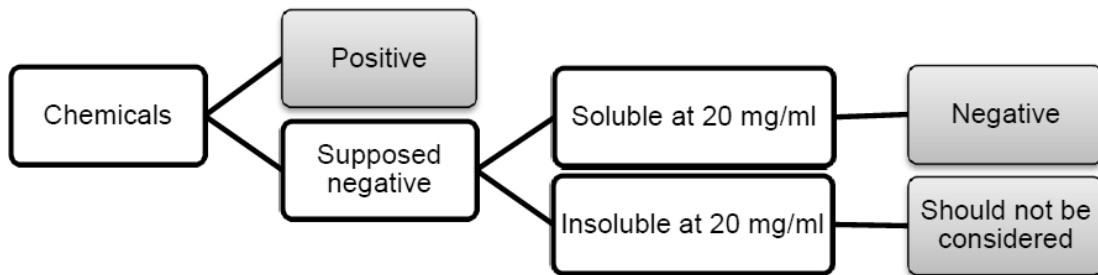


図2 感作性予測モデル

3-7. 試験成立の条件

IL-8 Luc assay においては、以下の条件が成立する必要がある。

- 試験毎に設定する陽性対照物質(4-NBB)の少なくとも1濃度で Ind-IL8LA が 5.0 より高い。
- 試験毎に設定する陰性対照物質(LA)の全ての濃度で Ind-IL8LA が 1.4 より低い。
- 対照区(細胞と Tripluc® はあり、被験物質は無処置)における GAPLA の値が媒体対照区(50 μ L/well の 10%FBS 含有 RPMI-1640 に 50 μ L/well の X-VIVO™ 15)の 1/5 より低いプレートは採用不可とする。
- 媒体対照区および被験物質曝露区の全ての濃度における Inh-GAPLA の値が 0.05 より低いプレートは採用不可とする。

3-8. 試験手順および判定方法に関する樹状細胞を指標とした他試験との比較

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 や U-SENS™ との比較が想定される。しかし、h-CLAT および U-SENS™ が細胞表面抗原の発現に着目している一方、本法では IL-8 遺伝子の活性化を指標としているため、両者を単純に比較する事は困難である。

IL-8 Luc assay の最大の利点は、培養時間の短縮化と操作の簡便化にあると言える。h-CLAT と U-SENS™ がそれぞれ 24 時間および 45 時間の培養を必要とするのに対し、IL-8 Luc assay は 16 時間で終了し、操作も比較的単純である。細胞の維持にも一般的な培地を用いており、継代頻度や手間も h-CLAT および U-SENS™ と同等と考えられる。

一方、難点としては、本法の調製媒体として推奨されている X-VIVO™ 15 に溶解しない被験物質において、判定不可と判断される点が挙げられる。

4. 精度

Phase 0(技術移転性の評価)および Phase I、IIa、IIb、IIc、III、IV(6つのバリデーション研究)が、JaCVAM 主導で行われ⁵⁾、続いてバリデーション結果に関して ICATM 等の支援による第三者評価⁶⁾を受けた。

4-1. 技術移転性

Phase 0 として、参加する A、B、C の3施設が主導施設から IL-8 Luc assay の説明を受け、感作性物質の 4-NBB、Tetramethylthiuram disulfide と非感作性物質の LA の3物

質をそれぞれ評価した(Lab A は 2 回、Lab B は 1 回、Lab C は 3 回)。合計 18 回の実験のうち、Lab A が UN GHS 1A である 4-NBB を非感作性物質と 1 回誤判定した以外は正しく判定された。バリデーション実行委員会(VMT)は IL-8 Luc assay の技術移転性の結果を妥当なものとした⁵⁾。

4-2. 再現性

施設間再現性を検討するために行われた Phase I において、感作性陰性の物質に関しては良好な結果であったが、陽性の物質に関しては偽陰性の結果が多く、陽性とする基準、濃度範囲、細胞と被験物質のインキュベーション時間、陽性対照物質の変更などを VMT から求められた。Phase IIa から Phase III においてこれらに対する改善が図られた。さらに、Phase IV において被験物質の培地中のタンパク質(FBS 等)への結合による被験物質ロスを減らし偽陰性を減らす目的で媒体を DMSO から X-VIVO™ 15 に変更した結果、予測精度も向上することが明らかとなった。技術移転性の結果を除き、Appendix 1 の数値はこれらの改善後の結果である⁵⁾。

次に、Phase 毎の改良のポイントと結果について述べる。Phase I は、原法の IL-8 Luc assay プロトコルで行われた。3 施設の施設間再現性は 70%であった。Phase IIa では、希釈濃度・希釈率等が修正された。施設間再現性は 70%であった。Phase IIb は、培養時間等が修正された。施設間再現性は 86%、施設内再現性は 78%だった。Phase IIc は、ルシフェラーゼ活性値のクライテリアが修正された。施設間再現性は 86%、施設内再現性は 71%だった。Phase III でもルシフェラーゼ活性値のクライテリアに修正が加えられ、施設間再現性は 95%だった。Phase IV では、予測性の向上を目的に溶媒が X-VIVO™-15 に変更された。施設間再現性は 91%、施設内再現性は 93%だった。ただしこれは 5 品のみ結果であり不十分と考えられたため、本評価書では、本試験法の再現性は DMSO と X-VIVO™ 15 の両方の結果より評価し、妥当と判断した。

バリデーション研究が多くの phase を経たことから、事前に先行バリデーション研究などでプロトコルの最適化を行っておくことの重要性が示唆された。

施設内と施設間の再現性はいずれも、適用 16 時間の Phase IIb、IIc、III(以上 DMSO 溶媒)および Phase IV (X-VIVO™ 15 溶媒)の結果をクライテリア 3 により評価して算出された。したがって、溶媒として異なる 2 種類(DMSO と X-VIVO™ 15)の結果を統合して再現性が評価された。なお、Phase IIb の結果はバリデーション研究終了後に改めてクライテリア 3 に基づいて評価された。

4-2-1. 施設内再現性

施設内再現性は Phase IIb, IIc および IV の結果(Appendix 1 参照)から算出された。施設内再現性は Lab A が 85.7%(12/14)、Lab B が 91.7%(11/12)、Lab C が 85.7%(12/14)、平均 87.7%であり⁵⁾、VMT の受け入れ基準(85%)を満たしており、本委員会は妥当と判断した。

4-2-2. 施設間再現性

施設間再現性は Phase IIb, IIc, III およびIVの結果(Appendix 1 参照)から算出された。施設間再現性は、87.5%(28/32)であり⁵⁾、VMT の受け入れ基準(80%)を満たしており、本委員会は妥当と判断した。

5. 正確度(感度および特異度)

バリデーション報告書⁵⁾によると、34 物質(Phase IIb から Phase IV、Appendix 1)を用いて3施設で行われた結果では、感度は75 から87%、特異度は90 から100%、正確度は79 から91%であった。

主導施設は、DPRa、KeratinSensTMおよびh-CLAT で検討された物質を網羅する143物質について、最終化されたプロトコル(ガイドライン収載)(媒体はX-VIVOTM 15)に従い、IL-8 Luc assay を行った。その結果をLLNA およびヒトのデータと比較した⁵⁾。143物質中判定不可の25物質を除く118物質をLLNA のデータ¹¹⁾と比較すると、感度96%(92/96)、特異度41%(9/22)、正確度86%(101/118)であった。143物質から適用範囲外の7物質を除いた136物質から、さらに判定不可の23物質を除いた113物質をLLNA と比較すると、感度96%(92/96)、特異度53%(9/17)、正確度89%(101/113)であった。

ヒトのデータ⁵⁾がある90物質のうち、判定不可の14物質を除く76物質では、感度93%(54/58)、特異度39%(7/18)、正確度80%(61/76)であった。適用範囲外の6物質と判定不可の13物質を除く71物質では、感度93%(54/58)、特異度54%(7/13)、正確度86%(61/71)であった。

6. 評価可能な物質の範囲

IL-8 Luc assay のバリデーション報告書⁵⁾には主導施設において検討された143物質を用いた評価結果が示されている。これは、本法開発当初の媒体であるDMSO と、評価物質の溶解性の改善のために用いることとした媒体X-VIVOTM 15を用いた結果である。これらに加えて、VMT との議論の中で予測方法の改善(Option 1 から Option 2)などが行われ、バリデーション報告書中にはX-VIVOTM 15を用いたOption 2の結果が合わせて表に載せられている。

予測モデルは以下のように定義された。Option 1 では、第1回から第4回までの実験で、2回の陽性結果を示した場合は陽性と判定する。3回の陰性結果を示した場合「Supposed negative」とする。この中で、第1回の実験でInh-GAPLA<0.8の化学物質と、Inh-GAPLA \geq 0.8でX-VIVOTM 15に20 mg/mL可溶の物質は陰性と評価する。Inh-GAPLA \geq 0.8でX-VIVOTM 15に不溶であれば判定不可と評価する。

Option 2 では、第1回から第4回までの実験で、2回の陽性結果を示した場合は陽性と判定する。3回の陰性結果を示した場合「Supposed negative」とする。この中で、X-VIVOTM 15に20 mg/mLの濃度で可溶であれば陰性と評価し、不溶であれば判定不可と評価する。

最終的にOption 2が採用されたが、この予測モデルでは、被験物質が20 mg/mLで溶

解するか否かを判定基準とし、どの実験室でも明快で容易に判断できることを挙げている。しかも、この予測モデルの採用結果をみると、原法の施設内および施設間再現性の判定と大きく乖離していないし、むしろ正確度と感度は有意に向上し、評価の性能は原法と有意な差はないとバリデーション報告書には記載されている。

この表の一部に誤植(ガイドラインの記載内容には影響しない)が認められたため、開発者に確認して修正したものが Appendix 2 である。143 物質のうち 25 物質(LLNA で陽性が 11 物質、陰性が 14 物質)が判定不可である。さらに、5 物質(LLNA ですべて陰性)は、いずれも細胞毒性を示す界面活性剤系の物質で適用範囲外である。なお、判定不可の中にある 2 物質(LLNA ですべて陽性)は酸無水物で、適用範囲外にも含まれている。

IL-8 Luc assay で評価している 143 物質の判定方法および媒体の変更に伴って判定の結果がどのように変化したのかを、バリデーション報告書 217 頁(Appendix 16. Table S2 Option 1)および 269 頁(Appendix 16. Table S2 Option 2)のデータをもとにまとめたのが表 2 である。さらに、本評価書 Appendix 2 に載せた表の 143 物質の判定の推移を表 2 の物質から適用範囲外の物質を除いて同様にまとめたのが表 3 である。

いずれの表を見ても、媒体を DMSO から X-VIVO™ 15 に変更したことによって感度、正確度、および特異度は大きく変わらなかった。

判定方法を Option 1(Op-1)から Option 2(Op-2)へと変えたことによって、感度がさらに高くなり、特異度は低くなっている。これは判定不可(ガイドライン上では陰性でも陽性でもなく“Should not be considered”とされ、バリデーション報告書の表中では“inconclusive”とされている)とされた物質数が分母から除外(適用外も同様)されたためである。このことにより、特に LLNA やヒトのデータで非感作性と評価されている物質が除外候補となる確率が高く、結果的に陰性物質の評価数が減少してしまっている。したがって、被験物質が感作性陰性であることを示すための試験においては、X-VIVO™ 15 の使用が適切であるとする十分なデータがないと考えられる。

表 2 IL-8 Luc assay で評価している 143 物質の判定の推移*

LLNA	右記条件での判定	DMSO	X-VIVO™ 15	Op-1	Op-2
Sen (107 物質)	Sen	82	92	92	92
	Non-sen	25	15	9	4
	Inconclusive	---	---	6	11
Non-sen (36 物質)	Sen	11	13	13	13
	Non-sen	25	23	16	9
	Inconclusive	---	---	7	14
正確度 (%)		75 (107/143)	80 (115/143)	83 (108/130)	86 (101/118)
感度 (%)		77 (82/107)	86 (92/107)	91 (92/101)	96 (92/96)
特異度 (%)		69 (25/36)	64 (23/36)	55 (16/29)	41 (9/22)

*バリデーション報告書 217 頁および 269 頁の表データを使用、Sen : 陽性、Non-sen : 陰性、Inconclusive : 判定不可、小数第 1 位四捨五入

表 3 Appendix 2 に載せた 143 物質の判定の推移*

LLNA	右記条件での判定	DMSO	X-VIVO™ 15	(Op-1)**	Op-2
Sen (107 物質)	Sen	82	92	(92)	92
	Non-sen	23	13	(6)	4
	Out of AD	2	2	(2)	2
	Inconclusive	---	---	(7)	9
Non-sen (36 物質)	Sen	7	8	(8)	8
	Non-sen	24	23	(17)	9
	Out of AD	5	5	(5)	5
	Inconclusive	---	---	(6)	14
正確度 (%)		78 (106/136)	85 (115/136)	(89) (109/123)	89 (101/113)
感度 (%)		78 (82/105)	87 (92/105)	(94) (92/98)	96 (92/96)
特異度 (%)		77 (24/31)	74 (23/31)	(68) (17/25)	53 (9/17)

* Appendix 2 のデータを使用、表 2 の物質から適用範囲外の物質数を除いて正確度等が求められている。Sen : 陽性、Non-sen : 陰性、Out of AD : 適用範囲外、Inconclusive : 判定不可、小数第 1 位四捨五入、**開発者確認データ

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、X-VIVO™ 15 に 20 mg/mL の濃度で溶解しない陰性の物質は判定不能となる。現試験法では、完全に溶解しない場合、遠心で沈殿物を除き上清を適用するため、適用濃度が不明である。X-VIVO™ 15 に 20 mg/mL の濃度で溶解しない物質を感作性陰性と判断するためには、完全に溶解した溶液で評価をするか、上清中の被験物質濃度の測定をするなどの改良が望まれる。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。

バリデーション研究においては、酸無水物の偽陰性率が高かった。界面活性剤は、偽陽性となる可能性がある。さらに、ルシフェラーゼ活性に干渉する化合物は測定を妨害する可能性がある。以上より、酸無水物、界面活性剤およびルシフェラーゼ活性に干渉する化合物は適用範囲外である。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多くが正しく判定された(プレハプテン 11/11、プロハプテン 6/6、およびプロ/プレハプテン 6/8)⁵⁾。しかし、本細胞の代謝能は限定的である¹²⁾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がある。従って、プロハプテンやプレハプテンの可能性のある化合物の陰性結果の解釈は注意が必要である。

7. 有用性と限界

本法は細胞実験とルミノメーターを組み合わせた皮膚感作性試験法であり、ルミノメーターを保有し、その技術に習熟した施設であれば実施可能と思われる。ただし本試験法は 2 色同時発光のため、分離するフィルターを装着することができる特殊なルミノメーターが必要である。

本試験法は動物を用いない *in vitro* の手法であり、同じ目的のために実施される動物実験と比べ、より「動物の愛護及び管理に関する法律」および 3Rs の精神と合致している。

IL-8 Luc assay 実施の際に必要な消耗品費については、1 アッセイ当たり約 2.7 万円と試算され、LLNA(同約 10 万円)より低額であり、h-CLAT(同約 2 万円)や U-SENS™(同約 1.8 万円)とほぼ同程度であった。一方で、本試験法実施に必要な THP-G8 細胞は一般的な細胞バンクでは取り扱われておらず、現状では株式会社ジーピーシー研究所のみから入手可能であることから、価格面で h-CLAT や U-SENS™ で使用される THP-1 や U-937 と比較して割高になる可能性がある。さらに、入手には株式会社ジーピーシー研究所と譲渡契約(MTA)を締結する必要があり、現行の MTA(2018/2/9 付)では本試験法を実施できるのは受託試験機関(CRO)以外で細胞培養機器を保有し、自ら本細胞を培養し試験用細胞ストックを作製可能な施設である。こうした点は試験実施の際に留意すべき点であると考えられる。試験期間については、IL-8 Luc assay は最短 4 日間で実施可能であり、LLNA(同 1 週間)、U-SENS™(同 6 日間)や h-CLAT(同 6 日間)より短期間であった。

本試験法は、試験の実施と評価のための戦略的統合方式(IATA)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に使用することが可能である¹³⁾。しかし、強度感作性物質に比べて、軽度から中等度感作性物質で偽陰性の判

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 のサブカテゴリ分類への応用には適さない。

8. 結論

IL-8 Luc assay 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される際の IL-8 の発現亢進を利用し、化学物質刺激に対する IL-8 誘導活性をレポーター遺伝子アッセイによって被験物質の皮膚感作性を評価する *in vitro* 試験法である。

本法で使用される THP-G8 細胞は、h-CLAT で使用される THP-1 細胞（単球系培養細胞）に IL-8 プロモーターで制御される SLO 遺伝子と GAPDH プロモーターで制御される SLR 遺伝子を安定的に導入した細胞であり、SLO ($\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$) および SLR ($\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$) の発光をそれぞれに対応したフィルターを装備したルミノメーターで分別測定して感作性の有無を判定する。二種のルシフェラーゼレポーター遺伝子のうち、GAPDH プロモーターで制御される SLR 遺伝子の発現量は、細胞生存率の評価に加え、IL-8 プロモーター依存性 SLO 発現量の補正に利用される。

本試験法は、バリデーション研究実施中に、使用する媒体や感作性予測モデルの改善などが頻繁に行われた。その結果をもとに作成された TG 442E ANNEX III によれば、14 物質を用いて 3 施設で実施された施設内再現性の平均は 87.7%、32 物質を用いて 3 施設で実施された施設間再現性の平均は 87.5%であった。

TG 442E ANNEX III で示された媒体 X-VIVO™ 15 を用い、かつ TG 442E ANNEX III 収載の予測モデルによれば、LLNA のデータがある 143 物質について、判定不可の 25 物質を除いた 118 物質の評価では、感度 96%(92/96)、特異度 41%(9/22)、正確度 86%(101/118)であった。適用範囲外 7 物質および判定不可 23 物質を除いた 113 物質では、感度 96%(92/96)、特異度 53%(9/17)、正確度 89%(101/113)であった。143 物質のうち、ヒトのデータがある 90 物質について、判定不可の 14 物質を除く 76 物質の評価では、感度 93%(54/58)、特異度 39%(7/18)、正確度 80%(61/76)であった。適用範囲外 6 物質および判定不可 13 物質を除いた 71 物質では、感度 93%(54/58)、特異度 54%(7/13)、正確度 86%(61/71)であった。この 143 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。

IL-8 Luc assay 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、X-VIVO™ 15 に 20 mg/mL の濃度で溶解しない物質が陰性の場合には判定不可となる。X-VIVO™ 15 を用いる場合、評価された陰性物質が少ないこと、DMSO と比較して感度、正確度および特異度に大きな違いは見られないことから、X-VIVO™ 15 は媒体として DMSO よりも常に優れているとは一概には言えないと本委員会は考えている。

界面活性剤等の細胞毒性を引き起こすような物質、酸無水物、ルシフェラーゼ活性に干渉する物質などは適用範囲外である。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ているが、本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、その感作性が正しく検出されない可能性があり、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。

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。

なお、本法では 20mg/mL で X-VIVO™ 15 に溶解せず、陰性相当の結果となった場合は、判定不可となるが、現行結果からは特に陰性物質で判定不可となる割合が高いことから、陰性結果の判定に重点を置く場合には本法の適用には注意が必要である。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り、上記の点に留意して、証拠の重み付けや他の試験法との組み合わせで用いることを推奨する。

9. 利益相反(COI)について

特になし。

10. 引用文献（最終アクセス日：2019年11月1日）
- 1) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Available at: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788
 - 2) Corrigendum to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing
 - 3) REGULATION (EC) No 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 30 November 2009 on cosmetic products (recast) (Text with EEA relevance), Available at: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine_disruptors/docs/cosmetic_1223_2009_regulation_en.pdf
 - 4) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, Aiba S. (2011) An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci.*; 124:359-69
 - 5) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No. 267, ENV/JM/MONO (2017)19. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
 - 6) Report of the peer review panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) assay for in vitro skin sensitization. Series on testing and assessment. No.268 ENV/JM/MONO(2017)20. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
 - 7) OECD (2014) The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, OECD Publishing, Paris, Available at: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264221444-en>
 - 8) Nukada Y, Miyazawa M, Kosaka N, Ito Y, Sakaguchi H, Nishiyama N. (2008) Production of IL-8 in THP-1 cells following contact allergen stimulation via mitogen-activated protein kinase activation or tumor necrosis factor-alpha production. *J Toxicol Sci.*, 33, 175–85.
 - 9) Weber FC1, Németh T, Csepregi JZ, Dudeck A, Roers A, Ozsvári B, Oswald E, Puskás LG, Jakob T, Mócsai A, Martin SF. (2015) Neutrophils are required for both the sensitization and elicitation phase of contact hypersensitivity, *J. Exp. Med.*, 212 (1), 15-22.
 - 10) Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. (2017) NF- κ B signaling in inflammation, *Signal Transduct Target Ther.* 2, 17023.
 - 11) Kimura Y, Watanabe M, Suzuki N, Iwaki T, Yamakage K, Saito K, Nakajima Y, Fujimura C, Ohmiya Y, Omori T, Kojima H, Aiba S. (2018) The performance of an in vitro skin sensitisation test, IL-8 Luc assay (OECD442E), and the integrated approach with direct peptide reactive assay (DPRA), *J. Toxicol. Sci.*, 43 (12), 741-749.
 - 12) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and 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). *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 38:275-84.
 - 13) 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. Available at: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata-integrated-approaches-to-testing-and-assessment.htm>

Appendix 1 バリデーション研究 Phase IIb、IIc、III、IV の結果

Phase	Chemicals Repeat		No.	Chemical name	CAS No.	LLNA EC3	GHS Category	Lab A Judge	Lab B Judge	Lab C Judge
II b	5 coded	3 sets	1	p-Benzoquinone	106-51-4	0.099	1A	G(1/2)	G(1/2)	P(2/2)
								P(2/2)	P(2/2)	P(2/2)
								G(1/2)	P(2/2)	P(2/2)
			2	1-Thioglycerol	96-27-5	3.6	1B	P(4/4)	P(4/4)	P(4/4)
								P(2/3)	P(3/3)	P(3/3)
								P(3/3)	P(2/2)	P(3/3)
			3	Benzyl cinnamate	103-41-3	18.4	1B	P(4/4)	P(2/2)	P(4/4)
								P(3/3)	P(2/2)	P(3/3)
								P(4/4)	P(3/3)	P(3/3)
			4	Diethyl maleate	141-05-9	5.8	1B	N(0/3)	N(0/4)	N(0/3)
								N(0/3)	N(0/3)	N(0/4)
								N(0/3)	N(0/3)	N(1/4)
			5	2,4-Dichloronitrobenzene	611-06-3		NC	N(0/3)	N(0/3)	G(1/3)
								N(0/3)	G(0/2)	N(0/4)
								N(0/4)	G(1/3)	N(1/4)
II c	5 coded	3 sets	1	1,4-Phenylenediamine	106-50-3	0.0099	1A	P(2/2)	P(2/4)	N(1/4)
								P(2/4)	N(1/4)	N(1/4)
								P(3/4)	P(2/2)	P(2/3)
			2	2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	1.7	1A	P(2/2)	G(1/3)	P(2/3)
								P(2/2)	P(2/2)	P(2/2)
								P(2/2)	P(2/2)	P(2/2)
			3	Glycerol	56-81-5		NC	N(0/3)	N(0/4)	N(0/4)
								N(1/4)	N(0/3)	N(0/3)
								N(1/4)	N(1/4)	N(0/4)
			4	Isopropanol	67-63-0		NC	N(1/4)	P(2/2)	N(1/4)
								N(0/3)	P(2/2)	P(2/4)
								N(0/3)	P(2/4)	P(2/4)
			5	Methyl salicylate	119-36-8		NC	N(0/3)	N(0/3)	N(0/3)
								P(2/4)	N(0/4)	N(0/4)
								N(0/3)	N(1/4)	N(0/3)

III	20 coded	1 set	1	2,4-Dichloronitrobenzene	611-06-3		NC	N(1/4)	N(0/3)	N(0/3)
			2	DNCB(1-Chloro-2,4-dinitrobenzene)	97-00-7	0.06	1A	P(2/2)	P(2/2)	P(2/2)
			3	Glyoxal solution	107-22-2	0.8	1A	P(2/2)	G(1/3)	P(2/2)
			4	1,2-Benzisothiazol-3(2H)-one	2634-33-5	8	1B	P(2/2)	P(2/2)	P(2/2)
			5	Citral	5392-40-5	5	1B	P(2/2)	P(2/2)	P(2/2)
			6	4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7		NC	N(0/4)	N(0/3)	N(0/4)
			7	Beryllium sulphate	7787-56-6	0.001	1A	N(1/4)	N(0/3)	N(0/3)
			8	Formaldehyde	50-00-0	0.61	1A	P(2/3)	P(2/2)	P(2/3)
			9	Chlorpromazine HCL	69-09-0	0.14	1A	P(2/2)	P(2/2)	P(2/2)
			10	Chloramine T	127-65-1	0.4	1A	P(2/3)	P(2/2)	P(2/2)
			11	Benzyl salicylate	118-58-1	2.9	1B	P(2/2)	P(2/2)	P(2/3)
			12	Dihydroeugenol	2785-87-7	6.8	1B	P(2/3)	P(2/2)	P(2/2)
			13	Nickel chloride	7718-54-9		1B	P(2/2)	P(2/2)	P(2/2)
			14	Imidazolidinyl urea	39236-46-9	24	1B	P(2/3)	P(2/3)	P(2/2)
			15	R(+)-Limonene	5989-27-5	69	1B	P(2/2)	N(0/4)	N(0/3)
			16	Methylmethacrylate	80-62-6	90	1B	N(0/3)	N(0/4)	N(0/4)
			17	Benzyl alcohol	100-51-6		NC	N(0/4)	N(0/3)	N(0/3)
			18	Dimethyl isophthalate	1459-93-4		NC	N(0/3)	N(0/4)	N(1/4)
			19	4-Aminobenzoic acid	150-13-0		NC	N(0/3)	N(0/3)	N(0/4)
			20	Xylene	1330-20-7	95.8	NC	N(0/4)	N(0/3)	N(0/3)
IV	5 coded	3 sets	1	Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	28	1B	P(2/2)	P(2/4)	P(2/2)
								P(2/2)	P(2/2)	P(2/2)
								P(2/2)	P(2/2)	P(2/2)
			2	4-Nitrobenzylbromide	100-11-8	0.05	1A	P(2/2)	P(2/2)	P(2/2)
								P(2/2)	P(2/2)	P(2/2)
								P(2/2)	P(2/2)	P(2/2)
			3	4-Allylanisole	140-67-0	18	1B	P(2/2)	P(2/2)	P(2/2)
								P(2/2)	P(2/2)	P(2/2)
								P(2/2)	P(2/2)	P(2/2)
			4	Ethylendiamine	107-15-3	2.2	1B	P(2/4)	N(1/4)	N(0/3)
								P(2/3)	N(1/4)	N(1/4)
								P(2/2)	N(1/4)	N(1/4)
			5	Salicylic acid	69-72-7		NC	N(0/3)	N(1/4)	N(1/4)
								P(2/3)	N(1/4)	N(0/3)
								N(1/4)	N(0/3)	N(0/3)

P: positive, N: negative, G: inconclusive

Appendix 2 ガイドラインに記載された IL-8 Luc assay により得られた 143 物質の評価結果の比較

No.	CAS#	Chemical	GHS	LLNA Potency category	IL-8 Luc assay (DMSO)	IL-8 Luc assay (X-VIVO)	IL-8 Luc assay (Test Guideline protocol) (Op. 2)
1	93-91-4	1-Benzoylacetone (1-BA)	1A	Extreme	positive	positive	positive
2	1086-00-6	1-Chloromethylpyrene	1A	Extreme	positive	positive	positive
3	97-00-7	2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCEB)	1A	Extreme	positive	positive	positive
4	100-11-8	4-Nitrobenzyl bromide (4-NBB)	1A	Extreme	positive	positive	positive
5	20048-27-5	Bandrowski's base	1A	Extreme	positive	positive	positive
6	7787-56-6	Beryllium sulfate tetrahydrate	1A	Extreme	negative	positive	positive
7	70-34-8	Dinitrofluorobenzene	1A	Extreme	positive	positive	positive
8	886-38-4	Diphenylcyclopropenone (DPCP)	1A	Extreme	positive	positive	positive
9	15646-46-5	Oxazolone	1A	Extreme	negative	positive	positive
10	106-51-4	p-Benzoquinone	1A	Extreme	positive	positive	positive
11	7778-50-9	Potassium dichromate	1A	Extreme	positive	positive	positive
12	1154-59-2	Tetrachlorosalicylanilide	1A	Extreme	positive	positive	positive
13	123-31-9	1,4-Dihydroquinone	1A	Strong	positive	positive	positive
14	106-50-3	1,4-Phenylenediamine(PPD)	1A	Strong	negative	positive	positive
15	95-55-6	2-Aminophenol	1A	Strong	positive	positive	positive
16	5307-14-2	2-Nitro-1,4-phenylenediamine	1A	Strong	positive	negative	inconclusive
17	94-36-0	Benzoyl peroxide	1A	Strong	positive	negative	inconclusive
18	100-39-0	Benzyl bromide	1A	Strong	positive	positive	positive
19	127-65-1	Chloramine-T	1A	Strong	positive	positive	positive
20	69-09-0	Chlorpromazine hydrochloride	1A	Strong	positive	positive	positive
21	7646-79-9	Cobalt chloride hexahydrate	1A	Strong	positive	positive	positive
22	50-00-0	Formaldehyde	1A	Strong	positive	positive	positive
23	111-30-8	Glutaraldehyde	1A	Strong	positive	positive	positive
24	6259-76-3	Hexyl salicylate	1A	Strong	positive	negative	inconclusive
25	55406-53-6	Iodopropynyl butylcarbamate	1A	Strong	positive	positive	positive
26	1166-52-5	Lauryl gallate	1A	Strong	positive	positive	positive
27	108-31-6	Maleic anhydride	1A	Strong	negative ^{out of AD}	negative ^{out of AD}	inconclusive, negative ^{out of AD}
28	35691-65-7	Methyldibromoglutaronitrile (MDGN)	1A	Strong	positive	positive	positive
29	85-44-9	Phthalic anhydride	1A	Strong	negative ^{out of AD}	negative ^{out of AD}	inconclusive, negative ^{out of AD}
30	121-79-9	Propyl gallate	1A	Strong	positive	positive	positive
31	90-15-3	1-Naphthol	1A	Moderate	positive	positive	positive
32	579-07-7	1-Phenyl-1,2-propanedione	1A	Moderate	positive	positive	positive
33	96-27-5	1-Thioglycerol(3-Mercapto-1,2-propanediol)	1B	Moderate	positive	positive	positive
34	2634-33-5	1,2-Benzisothiazolin-3-one	1B	Moderate	positive	positive	positive

No.	CAS#	Chemical	GHS	LLNA Potency category	IL-8 Luc assay (DMSO)	IL-8 Luc assay (X-VIVO)	IL-8 Luc assay (Test Guideline protocol) (Op. 2)
35	3344-77-2	12-Bromo-1-dodecanol	1B	Moderate	positive	positive	positive
36	818-61-1	2-Hydroxyethyl acrylate	1A	Moderate	negative	negative	negative
37	149-30-4	2-Mercaptobenzothiazole (2-MBT)	1A	Moderate	positive	positive	positive
38	93-51-6	2-Methoxy-4-methylphenol	1B	Moderate	positive	positive	positive
39	93-53-8	2-Phenylpropionaldehyde	1B	Moderate	positive	positive	positive
40	4313-03-5	2,4-Heptadienal	1B	Moderate	positive	positive	positive
41	591-27-5	3-Aminophenol	1B	Moderate	positive	positive	positive
42	109-55-7	3-Dimethylaminopropylamine	1B	Moderate	positive	positive	positive
43	17369-59-4	3-Propylidene-phthalide	1B	Moderate	positive	positive	positive
44	119-84-6	3,4-Dihydrocoumarin	1B	Moderate	negative	positive	positive
45	106-47-8	4-Chloroaniline	1B	Moderate	negative	positive	positive
46	21834-92-4	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	1B	Moderate	positive	positive	positive
47	101-39-3	a-Methylcinnamic aldehyde	1B	Moderate	positive	positive	positive
48	118-58-1	Benzyl salicylate	1B	Moderate	positive	positive	positive
49	122-57-6	Benzylideneacetone	1B	Moderate	positive	positive	positive
50	104-55-2	Cinnamic aldehyde (Cinnamal)	1B	Moderate	positive	positive	positive
51	23593-75-1	Clotrimazole	1B	Moderate	positive	negative	inconclusive
52	141-05-9	Diethyl maleate	1B	Moderate	negative	positive	positive
53	64-67-5	Diethyl sulfate	1B	Moderate	negative	positive	positive
54	111-40-0	Diethylenetriamine	1B	Moderate	positive	positive	positive
55	2785-87-7	Dihydroeugenol (2-Methoxy-4-propylphenol)	1B	Moderate	positive	positive	Positive
56	107-15-3	Ethylenediamine	1B	Moderate	negative	positive	Positive
57	107-22-2	Glyoxal	1A	Moderate	negative	positive	Positive
58	97-54-1	Isoeugenol	1A	Moderate	positive	positive	Positive
59	111-80-8	Methyl-2-nonynoate	1B	Moderate	negative	positive	Positive
60	2682-20-4	Methylisothiazolinone, 2-Methyl-2H-Isothiazol-3-one	1A	Moderate	positive	positive	Positive
61	10101-97-0	Nickel sulphate hexahydrate	1B	Moderate	positive	positive	Positive
62	7718-54-9	Nickel (II) chloride		Moderate	positive	positive	Positive
63	18031-40-8	Perillaldehyde	1B	Moderate	positive	positive	Positive
64	122-78-1	Phenylacetaldehyde	1B	Moderate	positive	positive	Positive
65	108-46-3	Resorcinol	1B	Moderate	positive	positive	Positive
66	133-37-9	Tartaric acid	1B	Moderate	positive	positive	Positive
67	137-26-8	Tetramethylthiuramdisulphide (TMTD)	1B	Moderate	positive	positive	Positive
68	6728-26-3	trans-2-Hexenal	1B	Moderate	positive	positive	Positive
69	552-30-7	Trimellitic anhydride	1B	Moderate	negative	positive	Positive

No.	CAS#	Chemical	GHS	LLNA Potency category	IL-8 Luc assay (DMSO)	IL-8 Luc assay (X-VIVO)	IL-8 Luc assay (Test Guideline protocol) (Op. 2)
70	112-45-8	Undec-10-enal	1B	Moderate	positive	positive	Positive
71	5989-27-5	(R)-(+)-Limonene	1B	Weak	negative	positive	Positive
72	111-25-1	1-Bromohexane	1B	Weak	negative	negative	inconclusive
73	103-11-7	2-Ethylhexyl acrylate	1B	Weak	positive	positive	Positive
74	431-03-8	2,3-Butanedione	1B	Weak	positive	positive	Positive
75	140-67-0	4-Allylanisole	1B	Weak	negative	positive	Positive
76	13706-86-0	5-Methyl-2,3-hexanedione	1B	Weak	negative	positive	Positive
77	514-10-3	Abietic acid	1B	Weak	positive	positive	Positive
78	122-40-7	Amyl cinnamic aldehyde	1B	Weak	positive	positive	Positive
79	62-53-3	Aniline	1B	Weak	negative	negative	Negative
80	94-09-7	Benzocaine	1B	Weak	negative	negative	inconclusive
81	103-41-3	Benzyl cinnamate	1B	Weak	positive	positive	Positive
82	1565-94-2	Bis-GMA	1B	Weak	positive	positive	Positive
83	2426-08-6	Butyl glycidyl ether	1B	Weak	positive	positive	Positive
84	104-54-1	Cinnamic alcohol	1B	Weak	positive	positive	Positive
85	5392-40-5	Citral	1B	Weak	positive	positive	Positive
86	103-95-7	Cyclamen aldehyde	1B	Weak	positive	positive	Positive
87	97-90-5	Ethylene glycol dimethacrylate	1B	Weak	negative	positive	Positive
88	97-53-0	Eugenol	1B	Weak	positive	positive	Positive
89	19317-11-4	Farnesal	1B	Weak	positive	positive	Positive
90	106-24-1	Geraniol	1B	Weak	positive	positive	Positive
91	101-86-0	Hexyl cinnamic aldehyde	1B	Weak	positive	positive	Positive
92	107-75-5	Hydroxycitronellal	1B	Weak	positive	positive	Positive
93	39236-46-9	Imidazolidinyl urea	1B	Weak	positive	positive	Positive
94	80-54-6	Lilial	1B	Weak	positive	positive	Positive
95	78-70-6	Linalool	1B	Weak	positive	positive	Positive
96	31906-04-4	Lylal	1B	Weak	positive	positive	Positive
97	80-62-6	Methyl methacrylate	1B	Weak	negative	negative	inconclusive
98	613-29-6	N,N-Dibutylaniline	1B	Weak	positive	positive	Positive
99	112-05-0	Nonanoic acid	1B	Weak	positive	positive	Positive
100	144-62-7	Oxalic acid	1B	Weak	positive	positive	Positive
101	61-33-6	Penicillin G	1B	Weak	negative	negative	Negative
102	87-86-5	Pentachlorophenol	1B	Weak	positive	positive	Positive
103	2050-14-8	Phenol, 2,2-azobis-	1B	Weak	positive	positive	Positive
104	93-99-2	Phenyl benzoate	1B	Weak	positive	negative	inconclusive
105	110-86-1	Pyridine	1B	Weak	negative	negative	Negative

No.	CAS#	Chemical	GHS	LLNA Potency category	IL-8 Luc assay (DMSO)	IL-8 Luc assay (X-VIVO)	IL-8 Luc assay (Test Guideline protocol) (Op. 2)
106	1330-20-7	Xylene	1B	Weak	negative	negative	inconclusive
107	127-51-5	α -iso-Methylionone	1B	Weak	positive	positive	Positive
108	109-65-9	1-Bromobutane	Non	negative	negative	negative	inconclusive
109	71-36-3	1-Butanol	Non	negative	negative	negative	Negative
110	874-23-7	2-Acetylcyclohexanone	Non	negative	positive	positive	Positive
111	923-26-2	2-Hydroxypropyl methacrylate	Non	negative	negative	negative	Negative
112	611-06-3	2,4-Dichloro-1-nitrobenzene	Non	negative	negative	negative	inconclusive
113	99-96-7	4-Hydroxybenzoic acid	Non	negative	negative	negative	inconclusive
114	92-48-8	6-Methylcoumarin	Non	negative	negative	negative	inconclusive
115	100-06-1	Acetoanisole (4-Methoxyacetophenone)	Non	negative	negative	negative	inconclusive
116	8001-54-5	Benzalkonium chloride	Non	negative	positive ^{out} of AD	positive ^{out} of AD	positive ^{out} of AD
117	65-85-0	Benzoic acid	Non	negative	negative	negative	inconclusive
118	100-51-6	Benzyl alcohol	Non	negative	negative	positive	Positive
119	108-90-7	Chlorobenzene	Non	negative	negative	negative	inconclusive
120	9004-54-0	Dextran	Non	negative	negative	negative	Negative
121	84-66-2	Diethyl phthalate	Non	negative	positive	positive	Positive
122	68-12-2	Dimethyl formamide	Non	negative	negative	negative	Negative
123	1459-93-4	Dimethyl isophthalate	Non	negative	negative	negative	inconclusive
124	94-02-0	Ethyl benzoylacetate	Non	negative	positive	negative	inconclusive
125	121-32-4	Ethyl vanilline	Non	negative	positive	positive	positive
126	492-94-4	Furil	Non	negative	positive	negative	inconclusive
127	56-81-5	Glycerol	Non	negative	negative	negative	negative
128	57-09-0	Hexadecyltrimethylammonium bromide	Non	negative	positive ^{out} of AD	positive ^{out} of AD	positive ^{out} of AD
129	67-63-0	Isopropanol	Non	negative	negative	negative	negative
130	50-21-5	Lactic acid	Non	negative	negative	negative	negative
131	119-36-8	Methyl salicylate	Non	negative	negative	negative	inconclusive
132	124-07-2	Octanoic acid (Caprylic acid)	Non	negative	positive ^{out} of AD	positive ^{out} of AD	positive ^{out} of AD
133	150-13-0	p-Aminobenzoic acid	Non	negative	negative	negative	inconclusive
134	94-13-3	Propyl paraben	Non	negative	negative	positive	positive
135	57-55-6	Propylene glycol	Non	negative	negative	negative	negative
136	81-07-2	Saccharin	Non	negative	negative	positive	positive
137	69-72-7	Salicylic acid	Non	negative	negative	negative	inconclusive
138	151-21-3	Sodium lauryl sulfate	Non	negative	positive ^{out} of AD	positive ^{out} of AD	positive ^{out} of AD
139	3810-74-0	Streptomycin sulfate	Non	negative	negative	negative	negative
140	63-74-1	Sulfanilamide	Non	negative	negative	negative	inconclusive

No.	CAS#	Chemical	GHS	LLNA Potency category	IL-8 Luc assay (DMSO)	IL-8 Luc assay (X-VIVO)	IL-8 Luc assay (Test Guideline protocol) (Op. 2)
141	9005-65-6	Tween-80	Non	negative	positive ^{out} of AD	positive ^{out} of AD	positive ^{out} of AD
142	121-33-5	Vanillin	Non	negative	positive	positive	positive
143	7733-02-0	Zinc sulfate	Non	negative	positive	positive	positive

out of AD: out of applicability domain, inconclusive: Should not be considered

*KEY EVENT-BASED TEST GUIDELINE***IN VITRO SKIN SENSITISATION ASSAYS ADDRESSING THE KEY
EVENT ON ACTIVATION OF DENDRITIC CELLS ON THE
ADVERSE OUTCOME PATHWAY FOR SKIN SENSITISATION****GENERAL INTRODUCTION***Activation of dendritic cells Key Event based Test Guideline*

1. A skin sensitiser refers to a substance that will lead to an allergic response following skin contact as defined by the United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN GHS) (1). There is general agreement on the key biological events underlying skin sensitisation. The current knowledge of the chemical and biological mechanisms associated with skin sensitisation has been summarised as an Adverse Outcome Pathway (AOP) (2), starting with the molecular initiating event through intermediate events to the adverse effect, namely allergic contact dermatitis. In this instance, the molecular initiating event (i.e. the first key event) is the covalent binding of electrophilic substances to nucleophilic centres in skin proteins. The second key event in this AOP takes place in the keratinocytes and includes inflammatory responses as well as changes in gene expression associated with specific cell signalling pathways such as the antioxidant/electrophile response element (ARE)-dependent pathways. The third key event is the activation of dendritic cells (DC), typically assessed by expression of specific cell surface markers, chemokines and cytokines. The fourth key event is T-cell activation and proliferation, which is indirectly assessed in the murine Local Lymph Node Assay (LLNA) (3).

2. This Test Guideline (TG) describes *in vitro* assays that address mechanisms described under the Key Event on activation of dendritic cells of the AOP for skin sensitisation (2). The TG comprises test methods to be used for supporting the discrimination between skin sensitisers and non-sensitisers in accordance with the UN GHS (1).

The test methods described in this TG are:

- Human Cell Line Activation test (h-CLAT)
- U937 cell line activation Test (U-SENSTM)
- Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay)

© OECD, (2018)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at <http://www.oecd.org/termsandconditions/>.

In accordance with the decision of the Council on a delegation of authority to amend Annex I of the decision of the council on the Mutual Acceptance of Data in the assessment of chemicals [C(2018)49], this Guideline was amended by the OECD's Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology by written procedure on 25 June 2018.

3. The test methods included in this Test Guideline may differ in relation to the procedure used to generate the data and the readouts measured but can be used indiscriminately to address countries' requirements for test results on the Key Event on activation of dendritic cells of the AOP for skin sensitisation while benefiting from the Mutual Acceptance of Data.

Background and principles of the test methods included in the Key Event based Test Guideline

4. The assessment of skin sensitisation has typically involved the use of laboratory animals. The classical methods that use guinea-pigs, the Guinea Pig Maximisation Test (GPMT) of Magnusson and Kligman, and the Buehler Test (TG 406) (4), assess both the induction and elicitation phases of skin sensitisation. The murine tests, the LLNA (TG 429) (3) and its two non-radioactive modifications, LLNA: DA (TG 442 A) (5) and LLNA: BrdU-ELISA (TG 442 B) (6), all assess the induction response exclusively, and have also gained acceptance, since they provide an advantage over the guinea pig tests in terms of animal welfare together with an objective measurement of the induction phase of skin sensitisation.

5. Recently mechanistically-based *in chemico* and *in vitro* test methods addressing the first key event (OECD TG 442C; Direct Peptide Reactivity Assay (7)), and second key event (OECD TG 442D; ARE-Nrf2 Luciferase Test Method (8)) of the skin sensitisation AOP have been adopted for contributing to the evaluation of the skin sensitisation hazard potential of chemicals.

6. Test methods described in this TG either quantify the change in the expression of cell surface marker(s) associated with the process of activation of monocytes and DC following exposure to sensitisers (e.g. CD54, CD86) or the changes in IL-8 expression, a cytokine associated with the activation of DC. Skin sensitisers have been reported to induce the expression of cell membrane markers such as CD40, CD54, CD80, CD83, and CD86 in addition to induction of proinflammatory cytokines, such as IL-1 β and TNF- α , and several chemokines including IL-8 (CXCL8) and CCL3 (9) (10) (11) (12), associated with DC activation (2).

7. However, as DC activation represents only one key event of the skin sensitisation AOP (2) (13), information generated with test methods measuring markers of DC activation alone may not be sufficient to conclude on the presence or absence of skin sensitisation potential of chemicals. Therefore data generated with the test methods described in this Test Guideline are proposed to support the discrimination between skin sensitisers (i.e. UN GHS Category 1) and non-sensitisers when used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA), together with other relevant complementary information, e.g. derived from *in vitro* assays addressing other key events of the skin sensitisation AOP as well as non-testing methods, including read-across from chemical analogues (13). Examples of the use of data generated with these methods within Defined Approaches, i.e. approaches standardised both in relation to the set of information sources used and in the procedure applied to the data to derive predictions, have been published (13) and can be employed as useful elements within IATA.

8. The test methods described in this Test Guideline cannot be used on their own, neither to sub-categorise skin sensitisers into subcategories 1A and 1B as defined by UN GHS (1), for authorities implementing these two optional subcategories, nor to predict potency for safety assessment decisions. However, depending on the regulatory framework, positive results generated with these methods may be used on their own to classify a chemical into UN GHS category 1.

9. The term "test chemical" is used in this Test Guideline to refer to what is being tested¹ and is not related to the applicability of the test methods to the testing of mono-constituent substances, multi-constituent substances and/or mixtures. Limited information is currently available on the applicability of the test methods to multi-constituent substances/mixtures (14) (15). The test methods are nevertheless technically applicable to the testing of multi-constituent substances and mixtures. When considering testing of mixtures, difficult-to-test chemicals (e.g. unstable), or test chemicals not clearly within the applicability domain described in this Guideline, upfront consideration should be given to whether the results of such testing will yield results that are meaningful scientifically. Moreover, when testing multi-constituent substances or mixtures, consideration should be given to possible interference of cytotoxic constituents with the observed responses.

LITERATURE

1. United Nations UN (2015), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1.
Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html].
2. OECD (2012), The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
3. OECD (2010), The Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 429, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
4. OECD (1992), Skin Sensitisation. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 406, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
5. OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay: DA. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442A, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
6. OECD (2010), Skin sensitisation: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442B, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
7. OECD (2015), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

¹ In June 2013, the Joint Meeting agreed that where possible, a more consistent use of the term "test chemical" describing what is being tested should be applied in new and updated Test Guidelines.

8. OECD (2015), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
9. Steinman RM. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-96.
10. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. 1994. B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841-7.
11. Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. 1997. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031-8.
12. Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami H. 2003. p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390-8.
13. OECD (2016). Series on Testing & Assessment No. 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. [ENV/JM/HA\(2016\)29](#). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<https://community.oecd.org/community/iatass>].
14. 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 sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
15. Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

APPENDIX II

PROFICIENCY SUBSTANCES

Prior to routine use of the test method described in this Annex to Test Guideline 442E, laboratories should demonstrate technical proficiency by correctly obtaining the expected U-SENS™ prediction for the 10 substances recommended in Table 1 and by obtaining CV70 and EC150 values that fall within the respective reference range for at least 8 out of the 10 proficiency substances. Proficiency substances were selected to represent the range of responses for skin sensitisation hazards. Other selection criteria were that the substances are commercially available, and that high-quality *in vivo* reference data as well as high quality *in vitro* data generated with the U-SENS™ method are available. Also, published reference data are available for the U-SENS™ method (1) (8).

Table 1: Recommended substances for demonstrating technical proficiency with the U-SENS™ method

Proficiency substances	CASRN	Physical state	<i>In vivo</i> prediction ¹	U-SENS™ Solvent/ Vehicle	U-SENS™ CV70 Reference Range in µg/mL ²	U-SENS™ EC150 Reference Range in µg/mL ²
4-Phenylenediamine	106-50-3	Solid	Sensitiser (strong)	Complete medium ³	<30	Positive (≤10)
Picryl sulfonic acid	2508-19-2	Liquid	Sensitizer (strong)	Complete medium	>50	Positive (≤50)
Diethyl maleate	141-05-9	Liquid	Sensitiser (moderate)	DMSO	10-100	Positive (≤20)
Resorcinol	108-46-3	Solid	Sensitiser (moderate)	Complete medium	>100	Positive (≤50)
Cinnamic alcohol	104-54-1	Solid	Sensitiser (weak)	DMSO	>100	Positive (10-100)
4-Allylanisole	140-67-0	Liquid	Sensitiser (weak)	DMSO	>100	Positive (≤200)
Saccharin	81-07-2	Solid	Non-sensitiser	DMSO	>200	Negative (>200)
Glycerol	56-81-5	Liquid	Non-sensitiser	Complete medium	>200	Negative (>200)
Lactic acid	50-21-5	Liquid	Non-sensitiser	Complete medium	>200	Negative (>200)
Salicylic acid	69-72-7	Solid	Non-sensitiser	DMSO	>200	Negative (>200)

Abbreviations: CAS RN = Chemical Abstracts Service Registry Number

¹ The *in vivo* hazard and (potency) prediction is based on LLNA data (1) (8). The *in vivo* potency is derived using the criteria proposed by ECETOC (17).

² Based on historical observed values (1) (8).

³ Complete medium: RPMI-1640 medium supplemented with 10% foetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (8).

ANNEX III: IN VITRO SKIN SENSITISATION: IL-8 LUC ASSAY

INITIAL CONSIDERATIONS AND LIMITATIONS

1. In contrast to assays analysing the expression of cell surface markers, the IL-8-Luc assay quantifies changes in IL-8 expression, a cytokine associated with the activation of dendritic cells (DC). In the THP-1-derived IL-8 reporter cell line (THP-G8, established from the human acute monocytic leukemia cell line THP-1), IL-8 expression is measured following exposure to sensitisers (1). The expression of luciferase is then used to aid discrimination between skin sensitisers and non-sensitisers.

2. The IL-8 Luc method has been evaluated in a validation study (2) conducted by the Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods (JaCVAM), the **Ministry of Economy, Trade and Industry** (METI), and the Japanese Society **for Alternatives to Animal Experiments** (JSAAE) and subsequently subjected to independent peer review (3) under the auspices of JaCVAM and the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) with the support of the **International Cooperation on Alternative Test Methods** (ICATM). Considering all available evidence and input from regulators and stakeholders, the IL-8 Luc assay is considered useful as part of IATA to discriminate sensitisers from non-sensitisers for the purpose of hazard classification and labelling. Examples of the use of IL-8 Luc assay data in combination with other information are reported in the literature (4) (5) (6).

3. The IL-8 Luc assay proved to be transferable to laboratories experienced in cell culture and luciferase measurement. Within and between laboratory reproducibilities were 87.7% and 87.5%, respectively (2). Data generated in the validation study (2) and other published work (1) (6) show that versus the LLNA, the IL-8 Luc assay judged 118 out of 143 chemicals as positive or negative and judged 25 chemicals as inconclusive and the accuracy of the IL-8 Luc assay in distinguishing skin sensitisers (UN GHS Cat. 1) from non-sensitisers (UN GHS No Cat.) is 86% (101/118) with a sensitivity of 96% (92/96) and specificity of 41% (9/22). Excluding substances outside the applicability domain described below (paragraph 5), the IL-8 Luc assay judged 113 out of 136 chemicals as positive or negative and judged 23 chemicals as inconclusive and the accuracy of the IL-8 Luc assay is 89% (101/113) with sensitivity of 96% (92/96) and specificity of 53% (9/17). Using human data cited in Urbisch et al. (7), the IL-8 Luc assay judged 76 out of 90 chemicals as positive or negative and judged 14 chemicals as inconclusive and the accuracy is 80% (61/76), sensitivity is 93% (54/58) and specificity is 39% (7/18). Excluding substances outside the applicability domain, the IL-8 Luc assay judged 71 out of 84 chemicals as positive or negative and judged 13 chemicals as inconclusive and the accuracy is 86% (61/71) with sensitivity of 93% (54/58) and specificity of 54% (7/13). False negative predictions with the IL-8 Luc assay are more likely to occur with chemicals showing low/moderate skin sensitisation potency (UN GHS subcategory 1B) than those with high potency (UN GHS subcategory 1A) (6). Together, the information supports a role for the IL-8 Luc assay in the identification of skin sensitisation hazards. The accuracy given for the IL-8 Luc assay as a standalone test method is only for guidance, as the method should be considered in combination with other sources of information in the context of an IATA and in accordance with the provisions of paragraphs 7 and 8 in the General introduction. Furthermore, when evaluating non-animal methods for skin sensitisation, it should be remembered that the LLNA and other animal tests may not fully reflect the situation in humans.

4. On the basis of the data currently available, the IL-8 Luc assay was shown to be applicable to test chemicals covering a variety of organic functional groups, reaction mechanisms, skin sensitisation potency (as determined in *in vivo* studies) and physicochemical properties (2) (6).

5. Although the IL-8 Luc assay uses X-VIVO™ 15 as a solvent, it correctly evaluated chemicals with a Log K_{ow} >3.5 and those with a water solubility of around 100 µg/ mL as calculated by EPI Suite™ and its performance to detect sensitisers with poor water solubility is better than that of the IL-8 Luc assay using dimethyl sulfoxide (DMSO) as a solvent (2). However, negative results for test chemicals that are not dissolved at 20 mg/ml may produce false negative results due to their inability to dissolve in X-VIVO™ 15. Therefore, negative results for these chemicals should not be considered. A high false negative rate for anhydrides was seen in the validation study. Furthermore, because of the limited metabolic capability of the cell line (8) and the experimental conditions, pro-haptens (substances requiring metabolic activation) and pre-haptens (substances activated by air oxidation) might give negative results in the assay. However, although negative results for suspected pre/prohaptens should be interpreted with caution, the IL-8 Luc assay correctly judged 11 out of 11 pre-haptens, 6/6 pro-haptens, and 6/8 pre/prohaptens in the IL-8 Luc assay data set (2). Based on the recent comprehensive review on three non-animal methods (the DPRA, the KeratinoSens™ and the h-CLAT) to detect pre and prohaptens (9), and based on the fact that THP-G8 cells used in the IL-8 Luc assay is a cell line derived from THP-1 that is used in the h-CLAT, the IL-8 Luc assay may also contribute to increase the sensitivity of non-animal methods to detect pre and pro-haptens in the combination of other methods. Surfactants tested so far gave (false) positive results irrespective of their type (e.g. cationic, anionic or on-ionic). Finally, chemicals that interfere with luciferase can confound its activity/measurement, causing apparent inhibition or increased luminescence (10). For example, phytoestrogen concentrations higher than 1 µM were reported to interfere with luminescence signals in other luciferase-based reporter gene assays due to over-activation of the luciferase reporter gene. Consequently, luciferase expression obtained at high concentrations of phytoestrogens or compounds suspected of producing phytoestrogen-like activation of the luciferase reporter gene needs to be examined carefully (11). Based on the above, surfactants, anhydrides and chemicals interfering with luciferase are outside the applicability domain of this assay. In cases where there is evidence demonstrating the non-applicability of the IL-8 Luc assay to other specific categories of test chemicals, the method should not be used for those specific categories.

6. As described above, the IL-8 Luc assay supports discrimination of skin sensitisers from non-sensitisers. Further work, preferably based on human data, is required to determine whether IL-8 Luc results can contribute to potency assessment when considered in combination with other information sources.

7. Definitions are provided in Appendix I.

PRINCIPLE OF THE TEST

8. The IL-8 Luc assay makes use of a human monocytic leukemia cell line THP-1 that was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Using this cell line, the Dept. of Dermatology, Tohoku University School of Medicine, established a THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8, that harbours the Stable Luciferase Orange (SLO) and Stable Luciferase Red (SLR) luciferase genes under the control of the IL-8 and **glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)** promoters, respectively (1). This allows quantitative measurement of luciferase gene induction by detecting luminescence from well-established light producing luciferase substrates as an indicator of the activity of the IL-8 and GAPDH in cells following exposure to sensitising chemicals.

9. The dual-colour assay system comprises an orange-emitting luciferase (SLO; $\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$) (12) for the gene expression of the IL-8 promoter as well as a red-emitting luciferase (SLR; $\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$) (13) for the gene expression of the internal control promoter, GAPDH. The two luciferases emit different colours upon reacting with firefly D-luciferin and their luminescence is measured simultaneously in a one-step reaction by dividing the emission from the assay mixture using an optical filter (14) (Appendix II).

10. THP-G8 cells are treated for 16 hours with the test chemical, after which SLO luciferase activity (SLO-LA) reflecting IL-8 promoter activity and SLR luciferase activity (SLR-LA) reflecting GAPDH promoter activity are measured. To make the abbreviations easy to understand, SLO-LA and SLR-LA are designated as IL8LA and GAPLA, respectively. Table 1 gives a description of the terms associated with luciferase activity in the IL-8 Luc assay. The measured values are used to calculate the normalised IL8LA (nIL8LA), which is the ratio of IL8LA to GAPLA; the induction of nIL8LA (Ind-IL8LA), which is the ratio of the arithmetic means of quadruple-measured values of the nIL8LA of THP-G8 cells treated with a test chemical and the values of the nIL8LA of untreated THP-G8 cells; and the inhibition of GAPLA (Inh-GAPLA), which is the ratio of the arithmetic means of quadruple-measured values of the GAPLA of THP-G8 cells treated with a test chemical and the values of the GAPLA of untreated THP-G8 cells, and used as an indicator for cytotoxicity.

Table 1. Description of terms associated with the luciferase activity in the IL-8 Luc assay

Abbreviations	Definition
GAPLA	SLR luciferase activity reflecting GAPDH promoter activity
IL8LA	SLO luciferase activity reflecting IL-8 promoter activity
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA of THP-G8 cells treated with chemicals / nIL8LA of untreated cells
Inh-GAPLA	GAPLA of THP-G8 treated with chemicals / GAPLA of untreated cells
CV05	The lowest concentration of the chemical at which Inh-GAPLA becomes < 0.05.

11. Performance standards (PS) (15) are available to facilitate the validation of modified *in vitro* IL-8 luciferase test methods similar to the IL-8 Luc assay and allow for timely amendment of this Test Guideline for their inclusion. Mutual Acceptance of Data (MAD) will only be guaranteed for test methods validated according to the PS, if these test methods have been reviewed and included in this Test Guideline by the OECD (16).

DEMONSTRATION OF PROFICIENCY

12. Prior to routine use of the test method described in this Annex to Test Guideline 442E, laboratories should demonstrate technical proficiency, using the 9 Proficiency Substances listed in Appendix III in compliance with the Good *in vitro* Method Practices (17). Moreover, test method users should maintain a historical database of data generated with the reactivity checks (see paragraph 15) and with the positive and solvent/vehicle controls (see paragraphs 21-24), and use these data to confirm the reproducibility of the test method in their laboratory is maintained over time.

PROCEDURE

13. The Standard Operating Procedure (SOP) for the IL-8 Luc assay is available and should be employed when performing the test (18). Laboratories willing to perform the test can obtain the recombinant THP-G8 cell line from GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, upon signing a Material Transfer Agreement (MTA) in line with the conditions of the OECD template. The following paragraphs provide a description of the main components and procedures of the assay.

Preparation of cells

14. The THP-G8 cell line from GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, should be used for performing the IL-8 Luc assay (see paragraphs 8 and 13). On receipt, cells are propagated (2-4 passages) and stored frozen as a homogeneous stock. Cells from this stock can be propagated up to a maximum of 12 passages or a maximum of 6 weeks. The medium used for propagation is the RPMI-1640 culture medium containing 10% foetal bovine serum (FBS), antibiotic/antimycotic solution (100U/mL of penicillin G, 100µg/mL of streptomycin and 0.25µg/mL of amphotericin B in 0.85% saline) (e.g. GIBCO Cat#15240-062), 0.15µg/mL Puromycin (e.g. CAS:58-58-2) and 300µg/mL G418 (e.g. CAS:108321-42-2).

15. Prior to use for testing, the cells should be qualified by conducting a reactivity check. This check should be performed 1-2 weeks or 2-4 passages after thawing, using the positive control, 4-nitrobenzyl bromide (4-NBB) (CAS:100-11-8, ≥ 99% purity) and the negative control, lactic acid (LA) (CAS:50-21-5, ≥85% purity). 4-NBB should produce a positive response to Ind-IL8LA (≥1.4), while LA should produce a negative response to Ind-IL8LA (<1.4). Only cells that pass the reactivity check are used for the assay. The check should be performed according to the procedures described in paragraphs 22-24.

16. For testing, THP-G8 cells are seeded at a density of 2 to 5 × 10⁵ cells/mL, and pre-cultured in culture flasks for 48 to 96 hours. On the day of the test, cells harvested from the culture flask are washed with RPMI-1640 containing 10% FBS without any antibiotics, and then, resuspended with RPMI-1640 containing 10% FBS without any antibiotics at 1 × 10⁶ cells/mL. Then, cells are distributed into a 96-well flat-bottom black plate (e.g. Costar Cat#3603) with 50µL (5 × 10⁴ cells/well).

Preparation of the test chemical and control substances

17. The test chemical and control substances are prepared on the day of testing. For the IL-8 Luc assay, test chemicals are dissolved in X-VIVO™ 15, a commercially available serum-free medium (Lonza, 04-418Q), to the final concentration of 20 mg/mL. X-VIVO™ 15 is added to 20 mg of test chemical (regardless of the chemical's solubility) in a microcentrifuge tube and brought to a volume of 1mL and then vortexed vigorously and shaken on a rotor at a maximum speed of 8 rpm for 30 min at an ambient temperature of about 20°C. Furthermore, if solid chemicals are still insoluble, the tube is sonicated until the chemical is dissolved completely or stably dispersed. For test chemicals soluble in X-VIVO™ 15, the solution is diluted by a factor of 5 with X-VIVO™ 15 and used as an X-VIVO™ 15 stock solution of the test chemical (4 mg/mL). For test chemicals not soluble in X-VIVO™ 15, the mixture is rotated again for at least 30 min, then centrifuged at 15,000 rpm (≈20,000g) for 5 min; the resulting supernatant is used as an X-VIVO™ 15 stock solution of the test chemical. A scientific rationale should be provided for the use of other solvents, such as DMSO, water, or the culture medium. The detailed procedure for dissolving chemicals is shown in Appendix V. The X-VIVO™ 15 solutions described in paragraphs 18-23 are mixed 1:1 (v/v) with the cell suspensions prepared in a 96-well flat-bottom black plate (see paragraph 16).

18. The first test run is aimed to determine the cytotoxic concentration and to examine the skin sensitising potential of chemicals. Using X-VIVO™ 15, serial dilutions of the X-VIVO™ 15 stock solutions of the test chemicals are made at a dilution factor of two (see Appendix V) using a 96-well assay block (e.g. Costar Cat#EW-01729-03). Next, 50 µl/well of diluted solution is added to 50 µl of the cell suspension in a 96-well flat-bottom black plate. Thus for test chemicals that are soluble in X-VIVO™ 15, the final concentrations of the test chemicals range from 0.002 to 2 mg/mL (Appendix V). For test chemicals that are not soluble in X-VIVO™ 15 at 20 mg/mL, only dilution factors that range from 2 to 2¹⁰, are determined, although the actual final concentrations of the test chemicals remain uncertain and are dependent on the saturated concentration of the test chemicals in the X-VIVO™ 15 stock solution.

19. In subsequent test runs (i.e. the second, third, and fourth replicates), the X-VIVO™ 15 stock solution is made at the concentration 4 times higher than the concentration of cell viability 05 (CV05; the lowest concentration at which the Inh-GAPLA becomes <0.05) in the first experiment. If Inh-GAPLA does not decrease below 0.05 at the highest concentration in the first run, the X-VIVO™ 15 stock solution is made at the first run highest concentration. The concentration of CV05 is calculated by dividing the concentration of the stock solution in the first run by dilution factor for CV05 (X) (dilution factor CV05 (X)); the dilution factor required to dilute stock solution to CV05 (see Appendix V). For test substances not soluble in X-VIVO at 20 mg/ml, CV05 is determined by the concentration of the stock solution x 1/X. For run 2 to 4, a second stock solution is prepared as 4 x CV50 (Appendix V).

20. Serial dilutions of the X-VIVO™ 15 second stock solutions are made at a dilution factor of 1.5 using a 96-well assay block. Next, 50 µl/well of diluted solution is added to 50 µl of the cell suspension in the wells of a 96-well flat-bottom black plate. Each concentration of each test chemical should be tested in 4 wells. The samples are then mixed on a plate shaker and incubated for 16 hours at 37°C and 5% CO₂, after which the luciferase activity is measured as described below.

21. The solvent control is the mixture of 50 µL/well of X-VIVO™ 15 and 50 µL/well of cell suspension in RPMI-1640 containing 10% FBS.

22. The recommended positive control is 4-NBB. 20 mg of 4-NBB is prepared in a 1.5-mL microfuge tube, to which X-VIVO™ 15 is added up to 1 mL. The tube is vortexed vigorously and shaken on a rotor at a maximum speed of 8 rpm for at least 30 min. After centrifugation at 20,000g for 5 min, the supernatant is diluted by a factor of 4 with X-VIVO™ 15, and 500 µl of the diluted supernatant is transferred to a well in a 96-well assay block. The diluted supernatant is further diluted with X-VIVO™ 15 at factors of 2 and 4, and 50 µl of the solution is added to 50 µl of THP-G8 cell suspension in the wells of a 96-well flat-bottom black plate (Appendix VI). Each concentration of the positive control should be tested in 4 wells. The plate is agitated on a plateshaker, and incubated in a CO₂ incubator for 16 hours (37°C, 5% CO₂), after which the luciferase activity is measured as described in paragraph 29.

23. The recommended negative control is LA. 20 mg of LA prepared in a 1.5-mL microfuge tube, to which X-VIVO™ 15 is added up to 1 mL (20 mg/ mL). Twenty mg/mL of LA solution is diluted by a factor of 5 with X-VIVO™ 15 (4 mg/mL); 500 µl of this 4 mg/mL LA solution is transferred to a well of a 96-well assay block. This solution is diluted by a factor of 2 with X-VIVO™ 15 and then diluted again by a factor of 2 to produce 2 mg/mL and 1 mg/mL solutions. 50 µl of these 3 solutions and vehicle control (X-VIVO™ 15) are added to 50 µl of THP-G8 cell suspension in the wells of a 96-well flat-bottom black plate. Each concentration of the negative control is tested in 4 wells. The plate is agitated on a plateshaker and incubated in a CO₂ incubator for 16 hours (37°C, 5% CO₂), after which the luciferase activity is measured as described in paragraph 29.

24. Other suitable positive or negative controls may be used if historical data are available to derive comparable run acceptance criteria.
25. Care should be taken to avoid evaporation of volatile test chemicals and cross-contamination between wells by test chemicals, e.g. by sealing the plate prior to the incubation with the test chemicals.
26. The test chemicals and solvent control require 2 to 4 runs to derive a positive or negative prediction (see Table 2). Each run is performed on a different day with fresh X-VIVO™ 15 stock solution of test chemicals and independently harvested cells. Cells may come from the same passage.

Luciferase activity measurements

27. Luminescence is measured using a 96-well microplate luminometer equipped with optical filters, e.g. Phelios (ATTO, Tokyo, Japan), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Germany) and the ARVO series (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The luminometer must be calibrated for each test to ensure reproducibility (19). Recombinant orange and red emitting luciferases are available for this calibration.
28. 100µL of pre-warmed Tripluc® Luciferase assay reagent (Tripluc) is transferred to each well of the plate containing the cell suspension treated with or without chemical. The plate is shaken for 10 min at an ambient temperature of about 20°C. The plate is placed in the luminometer to measure the luciferase activity. Bioluminescence is measured for 3 sec each in the absence (F0) and presence (F1) of the optical filter. Justification should be provided for the use of alternative settings, e.g. depending on the model of luminometer used.
29. Parameters for each concentration are calculated from the measured values, e.g. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, the mean ±SD of IL8LA, the mean ±SD of GAPLA, the mean ±SD of nIL8LA, the mean ±SD of Ind-IL8LA, the mean ±SD of Inh-GAPLA, and the 95% confidence interval of Ind-IL8LA. Definitions of the parameters used in this paragraph are provided in Appendices I and IV, respectively.
30. Prior to measurement, colour discrimination in multi-colour reporter assays is generally achieved using detectors (luminometer and plate reader) equipped with optical filters, such as sharp-cut (long-pass or short-pass) filters or band-pass filters. The transmission coefficients of the filters for each bioluminescence signal colour should be calibrated prior to testing, per Appendix II.

DATA AND REPORTING

Data evaluation

31. Criteria for a positive/negative decision require that in each run:

- an IL-8 Luc assay prediction is judged positive if a test chemical has a Ind-IL8LA ≥ 1.4 and the lower limit of the 95% confidence interval of Ind-IL8LA ≥ 1.0
- an IL-8 Luc assay prediction is judged negative if a test chemical has a Ind-IL8LA < 1.4 and/or the lower limit of the 95% confidence interval of Ind-IL8LA < 1.0

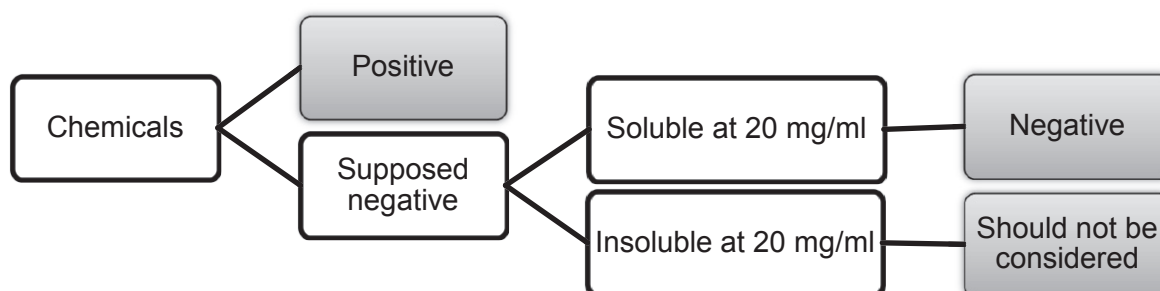
Prediction model

32. Test chemicals that provide two positive results from among the 1st, 2nd, 3rd or 4th runs are identified as positives whereas those that give three negative results from among the 1st, 2nd, 3rd or 4th runs are identified as supposed negative (Table 2). Among supposed negative chemicals, chemicals that are dissolved at 20 mg/ml of X-VOVO™ 15 are judged as negative, while chemicals that are not dissolved at 20 mg/ml of X-VOVO™ 15 should not be considered (Figure 1).

Table 2. Criteria for identifying positive and supposed negative

1st run	2nd run	3rd run	4th run	Final prediction	
Positive	Positive	-	-	Positive	
	Negative	Positive	-	Positive	
		Negative	Positive	Negative	Supposed negative
	Negative	Positive	Positive	-	Positive
Negative			Positive	Positive	
Negative		Positive	Positive	Negative	Supposed negative
			Negative	Positive	Positive
		Negative	Positive	Negative	Supposed negative
			Negative	-	Supposed negative

Figure 1. Prediction model for final judgment



Acceptance criteria

33. The following acceptance criteria should be met when using the IL-8 Luc assay:

- Ind-IL8LA should be more than 5.0 at least in one concentration of the positive control, 4-NBB, in each run.
- Ind-IL8LA should be less than 1.4 at any concentration of the negative control, lactic acid, in each run.
- Data from plates for which the GAPLA of control wells with cells and Tripluc but without chemicals is less than 5 times of that of well containing test medium only (50 μ L/well of RPMI-1640 containing 10% FBS and 50 μ L/well of X-VIVO™ 15) should be rejected.
- Data from plates for which the Inh-GAPLA of all concentrations of the test or control chemicals is less than 0.05 should be rejected. In this case, the first test should be repeated so the highest final concentration of the repeated test is the lowest final concentration of the previous test.

TEST REPORT

34. The test report should include the following information:

Test chemicals

- Mono-constituent substance:
 - Chemical identification, such as IUPAC or CAS name(s), CAS number(s), SMILES or InChI code, structural formula, and/or other identifiers;
 - Physical appearance, water solubility, molecular weight, and additional relevant physicochemical properties, to the extent available;
 - Purity, chemical identity of impurities as appropriate and practically feasible, etc;

- Treatment prior to testing, if applicable (e.g. warming, grinding);
 - Solubility in X-VIVO™ 15. For chemicals that are insoluble in X-VIVO™ 15, whether precipitation or flotation are observed after centrifugation;
 - Concentration(s) tested;
 - Storage conditions and stability to the extent available;
 - Justification for choice of solvent/vehicle for each test chemical if X-VIVO™ 15 has not been used.
- Multi-constituent substance, UVCB and mixture:
- Characterisation as far as possible by e.g. chemical identity (see above), purity, quantitative occurrence and relevant physicochemical properties (see above) of the constituents, to the extent available;
 - Physical appearance, water solubility, and additional relevant physicochemical properties, to the extent available;
 - Molecular weight or apparent molecular weight in case of mixtures/polymers of known compositions or other information relevant for the conduct of the study;
 - Treatment prior to testing, if applicable (e.g. warming, grinding);
 - Solubility in X-VIVO™ 15. For chemicals that are insoluble in X-VIVO™ 15, whether precipitation or flotation are observed after centrifugation;
 - Concentration(s) tested;
 - Storage conditions and stability to the extent available.
 - Justification for choice of solvent/vehicle for each test chemical, if X-VIVO™ 15 has not been used.

Controls

- Positive control:
- Chemical identification, such as IUPAC or CAS name(s), CAS number(s), SMILES or InChI code, structural formula, and/or other identifiers;
 - Physical appearance, water solubility, molecular weight, and additional relevant physicochemical properties, to the extent available and where applicable;
 - Purity, chemical identity of impurities as appropriate and practically feasible, etc;
 - Treatment prior to testing, if applicable (e.g. warming, grinding);
 - Concentration(s) tested;
 - Storage conditions and stability to the extent available;
 - Reference to historical positive control results demonstrating suitable acceptance criteria, if applicable.

- Negative control:
 - Chemical identification, such as IUPAC or CAS name(s), CAS number(s), and/or other identifiers;
 - Purity, chemical identity of impurities as appropriate and practically feasible, etc;
 - Physical appearance, molecular weight, and additional relevant physicochemical properties in the case other negative controls than those mentioned in the Test Guideline are used and to the extent available;
 - Storage conditions and stability to the extent available;
 - Justification for choice of solvent for each test chemical.

Test method conditions

- Name and address of the sponsor, test facility and study director;
- Description of test method used;
- Cell line used, its storage conditions, and source (e.g. the facility from which it was obtained);
- Lot number and origin of FBC, supplier name, lot number of 96-well flat-bottom black plate, and lot number of Tripluc reagent;
- Passage number and cell density used for testing;
- Cell counting method used for seeding prior to testing and measures taken to ensure homogeneous cell number distribution;
- Luminometer used (e.g. model), including instrument settings, luciferase substrate used, and demonstration of appropriate luminescence measurements based on the control test described in Appendix II;
- The procedure used to demonstrate proficiency of the laboratory in performing the test method (e.g. by testing of proficiency substances) or to demonstrate reproducible performance of the test method over time.

Test procedure

- Number of replicates and runs performed;
- Test chemical concentrations, application procedure and exposure time (if different from those recommended);
- Description of evaluation and decision criteria used;
- Description of study acceptance criteria used;
- Description of any modifications of the test procedure.

Results

- Measurements of IL8LA and GAPLA;
- Calculations for nIL8LA, Ind-IL8LA, and Inh-GAPLA;
- The 95% confidence interval of Ind-IL8LA;
- A graph depicting dose-response curves for induction of luciferase activity and viability;
- Description of any other relevant observations, if applicable.

Discussion of the results

- Discussion of the results obtained with the IL-8 Luc assay;
- Consideration of the assay results in the context of an IATA, if other relevant information is available.

Conclusion

LITERATURE

1. Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. 2011. An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359-69.
2. OECD (2017), Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No. 267, [ENV/JM/MONO\(2017\)19](#). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
3. OECD (2017), Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for in vitro skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No. 258, [ENV/JM/MONO\(2017\)20](#). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
2. OECD (2016), Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No. 256, [ENV/JM/MONO\(2016\)29](#). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
3. van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. 2014. Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371-9.
4. Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. 2015. Optimization of the IL-8 Luc assay as an in vitro test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816-30.
5. Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. 2015. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337-51.
6. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and 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). *Alternatives to laboratory animals* : *ATLA* 38:275-84.
7. Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? *Regul Toxicol Pharmacol*, online.
8. Thorne N, Inglese J, and Auld DS. 2010. Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chem Biol* 17:646-57.
9. OECD (2016), *Test No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists*, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.

10. Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. 2001. Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. *Biochem Biophys Res Commun* 280:1286-91.
11. Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. 1999. Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry* 38:8271-9.
12. Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. 2005. Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. *Biotechniques* 38:891-4.
13. OECD (2017), To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, France.
14. OECD (2005), Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.
15. OECD (2017), Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD%20Draft%20GIVIMP_v05%20-%20clean.pdf].
16. JaCVAM (2016), IL-8 Luc assay protocol, Available at. http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.
17. Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. 2010. Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem Photobiol* 86:1046-9.
18. OECD (2012), The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris, France.
19. United Nations (2015), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

APPENDIX I

DEFINITIONS

Accuracy: The closeness of agreement between test method results and accepted reference values. It is a measure of test method performance and one aspect of relevance. The term is often used interchangeably with concordance to mean the proportion of correct outcomes of a test method (16).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Sequence of events from the chemical structure of a target chemical or group of similar chemicals through the molecular initiating event to an *in vivo* outcome of interest (20).

CV05: Cell viability 05. Minimum concentration at which chemicals show less than 0.05 of Inh-GAPLA.

FInSLO-LA: Abbreviation used in the validation report and in previous publications regarding the IL-8 Luc assay to refer to Ind-IL8LA. See Ind-IL8LA for definition.

GAPLA: Luciferase Activity of Stable Luciferase Red (SLR) ($\lambda_{\max} = 630$ nm), regulated by GAPDH promoter and demonstrates cell viability and viable cell number.

Hazard: Inherent property of an agent or situation having the potential to cause adverse effects when an organism, system or (sub) population is exposed to that agent.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): A structured approach used for hazard identification (potential), hazard characterisation (potency) and/or safety assessment (potential/potency and exposure) of a chemical or group of chemicals, which strategically integrates and weights all relevant data to inform regulatory decision regarding potential hazard and/or risk and/or the need for further targeted and therefore minimal testing.

II-SLR-LA: Abbreviation used in the validation report and in previous publications regarding the IL-8 Luc assay to refer to Inh-GAPLA. See Inh-GAPLA for definition

IL-8 (Interleukin-8): A cytokine derived from endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, macrophages, and monocytes that causes chemotaxis of neutrophils and T-cell lymphocytes.

IL8LA: Luciferase Activity of Stable Luciferase Orange (SLO) ($\lambda_{\max} = 580$ nm), regulated by IL-8 promoter.

Ind-IL8LA: Fold induction of IL8LA. It is obtained by dividing the nIL8LA of THP-G8 cells treated with chemicals by that of non-stimulated THP-G8 cells and represents the induction of IL-8 promoter activity by chemicals.

Inh-GAPLA: Inhibition of GAPLA. It is obtained by dividing GAPLA of THP-G8 treated with chemicals with GAPLA of non-treated THP-G8 and represents cytotoxicity of chemicals.

Minimum induction threshold (MIT): the lowest concentration at which a chemical satisfies the positive criteria

Mixture: A mixture or a solution composed of two or more substances in which they do not react.

Mono-constituent substance: A substance, defined by its quantitative composition, in which one main constituent is present to at least 80% (w/w).

Multi-constituent substance: A substance, defined by its quantitative composition, in which more than one of the main constituents is present in a concentration $\geq 10\%$ (w/w) and $< 80\%$ (w/w). A multi-constituent substance is the result of a manufacturing process. The difference between mixture and multi-constituent substance is that a mixture is obtained by blending of two or more substances without chemical reaction. A multi-constituent substance is the result of a chemical reaction.

nIL8LA: The SLO luciferase activity reflecting IL-8 promoter activity (IL8LA) normalised by the SLR luciferase activity reflecting GAPDH promoter activity (GALPA). It represents IL-8 promoter activity after considering cell viability or cell number.

nSLO-LA: Abbreviation used in the validation report and in previous publications regarding the IL-8 Luc assay to refer to nIL8LA. See nIL8LA for definition

Positive control: A replicate containing all components of a test system and treated with a substance known to induce a positive response. To ensure that variability in the positive control response across time can be assessed, the magnitude of the positive response should not be excessive.

Pre-haptens: Chemicals which become sensitisers through abiotic transformation.

Pro-haptens: Chemicals requiring enzymatic activation to exert skin sensitisation potential.

Relevance: Description of relationship of the test to the effect of interest and whether it is meaningful and useful for a particular purpose. It is the extent to which the test correctly measures or predicts the biological effect of interest. Relevance incorporates consideration of the accuracy (concordance) of a test method (16).

Reliability: Measures of the extent that a test method can be performed reproducibly within and between laboratories over time, when performed using the same protocol. It is assessed by calculating intra- and inter-laboratory reproducibility and intra-laboratory repeatability (16).

Run: A run consists of one or more test chemicals tested concurrently with a solvent/vehicle control and with a positive control.

Sensitivity: The proportion of all positive/active chemicals that are correctly classified by the test. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results, and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (16).

SLO-LA: Abbreviation used in the validation report and in previous publications regarding the IL-8 Luc assay to refer to IL8LA. See IL8LA for definition.

SLR-LA: Abbreviation used in the validation report and in previous publications regarding the IL-8 Luc assay to refer to GAPLA. See GAPLA for definition.

Solvent/vehicle control: An untreated sample containing all components of a test system except of the test chemical, but including the solvent/vehicle that is used. It is used to establish the baseline response

for the samples treated with the test chemical dissolved or stably dispersed in the same solvent/vehicle. When tested with a concurrent medium control, this sample also demonstrates whether the solvent/vehicle interacts with the test system.

Specificity: The proportion of all negative/inactive chemicals that are correctly classified by the test. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (16).

Substance: Chemical elements and their compounds in the natural state or obtained by any production process, including any additive necessary to preserve the stability of the product and any impurities deriving from the process used, but excluding any solvent which may be separated without affecting the stability of the substance or changing its composition.

Surfactant: Also called surface-active agent, this is a substance, such as a detergent, that can reduce the surface tension of a liquid and thus allow it to foam or penetrate solids; it is also known as a wetting agent. (TG437)

Test chemical: The term "test chemical" is used to refer to what is being tested.

THP-G8: An IL-8 reporter cell line used in IL-8 Luc assay. The human macrophage-like cell line THP-1 was transfected the SLO and SLR luciferase genes under the control of the IL-8 and GAPDH promoters, respectively.

United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (UN GHS): A system proposing the classification of chemicals (substances and mixtures) according to standardised types and levels of physical, health and environmental hazards, and addressing corresponding communication elements, such as pictograms, signal words, hazard statements, precautionary statements and safety data sheets, so that to convey information on their adverse effects with a view to protect people (including employers, workers, transporters, consumers and emergency responders) and the environment (21).

UVCB: substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials.

Valid test method: A test method considered to have sufficient relevance and reliability for a specific purpose and which is based on scientifically sound principles. A test method is never valid in an absolute sense, but only in relation to a defined purpose.

APPENDIX II

**PRINCIPLE OF MEASUREMENT OF LUCIFERASE ACTIVITY AND DETERMINATION
OF THE TRANSMISSION COEFFICIENTS OF OPTICAL FILTER FOR SLO AND SLR**

MultiReporter Assay System -Tripluc- can be used with a microplate-type luminometer with a multi-colour detection system, which can equip an optical filter (e.g. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). The optical filter used in measurement is 600–620 nm long or short pass filter, or 600–700 nm band pass filter.

(1) Measurement of two-colour luciferases with an optical filter.

This is an example using Phelios AB-2350 (ATTO). This luminometer is equipped with a 600 nm long pass filter (R60 HOYA Co.), 600 nm LP, Filter 1) for splitting SLO ($\lambda_{\max} = 580$ nm) and SLR ($\lambda_{\max} = 630$ nm) luminescence.

To determine transmission coefficients of the 600 nm LP, first, using purified SLO and SLR luciferase enzymes, measure i) the intensity of SLO and SLR bioluminescence intensity without filter (F0), ii) the SLO and SLR bioluminescence intensity that passed through 600 nm LP (Filter 1), and iii) calculate the transmission coefficients of 600 nm LP for SLO and SLR listed below.

Transmission coefficients	Abbreviation	Definition
SLO Filter 1 Transmission coefficients	$\kappa_{O_{R60}}$	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR Filter 1 Transmission coefficients	$\kappa_{R_{R60}}$	The filter's transmission coefficient for the SLR

When the intensity of SLO and SLR in test sample are defined as O and R, respectively, i) the intensity of light without filter (all optical) F0 and ii) the intensity of light that transmits through 600 nm LP (Filter 1) F1 are described as below.

$$F0 = O + R$$

$$F1 = \kappa_{O_{R60}} \times O + \kappa_{R_{R60}} \times R$$

These formulas can be rephrased as follows:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa_{O_{R60}} & \kappa_{R_{R60}} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Then using calculated transmittance factors ($\kappa_{O_{R60}}$ and $\kappa_{R_{R60}}$) and measured F0 and F1, you can calculate O and R-value as follows:

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

Materials and methods for determining transmittance factor

(1) Reagents

· Single purified luciferase enzymes:

Lyophilised purified SLO enzyme

Lyophilised purified SLR enzyme

(which for the validation work were obtained from GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan with THP-G8 cell line)

· Assay reagent:

Tripluc[®] Luciferase assay reagent (for example from TOYOBO Cat#MRA-301)

· Medium: for luciferase assay (30 ml, stored at 2 – 8°C)

Reagent	Conc.	Final conc. in medium	Required amount
RPMI-1640	-	-	27 ml
FBS	-	10 %	3 ml

(2) Preparation of enzyme solution

Dissolve lyophilised purified luciferase enzyme in tube by adding 200 µl of 10 ~ 100 mM Tris/HCl or Hepes/HCl (pH 7.5 ~ 8.0) supplemented with 10% (w/v) glycerol, divide the enzyme solution into 10 µl aliquots in 1.5 ml disposable tubes and store them in a freezer at -80°C. The frozen enzyme solution can be used for up to 6 months. When used, add 1 ml of medium for luciferase assay (RPMI-1640 with 10% FBS) to each tube containing the enzyme solutions (diluted enzyme solution) and keep them on ice to prevent deactivation.

(3) Bioluminescence measurement

Thaw Tripluc[®] Luciferase assay reagent (Tripluc) and keep it at room temperature either in a water bath or at ambient air temperature. Power on the luminometer 30 min before starting the measurement to allow the photomultiplier to stabilise. Transfer 100 µl of the diluted enzyme solution to a black 96 well plate (flat bottom) (the SLO reference sample to #B1, #B2, #B3, the SLR reference sample to #D1, #D2, #D3). Then, transfer 100 µl of pre-warmed Tripluc to each well of the plate containing the diluted enzyme solution using a pipetman. Shake the plate for 10 min at room temperature (about 25°C) using a plate shaker. Remove bubbles from the solutions in wells if they appear. Place the plate in the luminometer to measure the luciferase activity. Bioluminescence is measured for 3 sec each in the absence (F0) and presence (F1) of the optical filter.

Transmission coefficient of the optical filter was calculated as follows:

Transmission coefficient (SLO ($\kappa_{O_{R60}}$))= (#B1 of F1+ #B2 of F1+ #B3 of F1) / (#B1 of F0+ #B2 of F0+ #B3 of F0)

Transmission coefficient (SLR ($\kappa_{R_{60}}$))= (#D1 of F1+ #D2 of F1+ #D3 of F1) / (#D1 of F0+ #D2 of F0+ #D3 of F0)

Calculated transmittance factors are used for all the measurements executed using the same luminometer.

Quality control of equipment

The procedures described in the IL-8 Luc protocol should be used (18).

APPENDIX III

PROFICIENCY SUBSTANCES

Prior to routine use of the test method described in this Annex to Test Guideline 442E, laboratories should demonstrate technical proficiency by obtaining the expected IL-8 Luc assay prediction for the 9 substances recommended in Table 1 and by obtaining values that fall within the respective reference range for at least 8 out of the 9 proficiency substances (selected to represent the range of responses for skin sensitisation hazards). Other selection criteria were that the substances are commercially available, and that high-quality *in vivo* reference data as well as high quality *in vitro* data generated with the IL-8 Luc assay are available. Also, published reference data are available for the IL-8 Luc assay (6) (1).

Table 1: Recommended substances for demonstrating technical proficiency with the IL-8 Luc assay

Proficiency substances	CAS no.	State	Solubility in X- VIVO15 at 20 mg/mL	<i>In vivo</i> prediction ¹	IL-8 Luc prediction ²	Reference range (µg/mL) ³	
						CV05 ⁴	IL-8 Luc MIT ⁵
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	Solid	Insoluble	Sensitiser (Extreme)	Positive	2.3-3.9	0.5-2.3
Formaldehyde	50-00-0	Liquid	Soluble	Sensitiser (Strong)	Positive	9-30	4-9
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	Solid	Insoluble	Sensitiser (Moderate)	Positive	250-290	60-250
Ethylenediamine	107-15-3	Liquid	Soluble	Sensitiser (Moderate)	Positive	500-700	0.1-0.4
Ethyleneglycol dimethacrylate	97-90-5	Liquid	Insoluble	Sensitiser (Weak)	Positive	>2000	0.04-0.1
4-Allylanisole (Estragol)	140-67-0	Liquid	Insoluble	Sensitiser (Weak)	Positive	>2000	0.01-0.07
Streptomycin sulphate	3810-74-0	Solid	Soluble	Non- sensitiser	Negative	>2000	>2000
Glycerol	56-81-5	Liquid	Soluble	Non- sensitiser	Negative	>2000	>2000
Isopropanol	67-63-0	Liquid	Soluble	Non- sensitiser	Negative	>2000	>2000

Abbreviations: CAS no. = Chemical Abstracts Service Registry Number

¹ The *in vivo* potency is derived using the criteria proposed by ECETOC (19).

² Based on historical observed values (1) (6).

³ CV05 and IL-8 Luc MIT were calculated using water solubility given by EPI Suite™.

⁴ CV05: the minimum concentration at which chemicals show less than 0.05 of Inh-GAPLA.

⁵ MIT: the lowest concentrations at which a chemical satisfies the positive criteria.

APPENDIX IV

INDEXES AND JUDGMENT CRITERIA

nIL8LA (nSLO-LA)

The j-th repetition (j = 1-4) of the i-th concentration (i = 0-11) is measured for IL8LA (SLO-LA) and GAPLA (SLR-LA) respectively. The normalised IL8LA, referred to as nIL8LA (nSLO-LA), and is defined as:

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

This is the basic unit of measurement in this assay.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

The fold increase of the averaged nIL8LA (nSLO-LA) for the repetition on the i-th concentration compared with it at the 0 concentration, Ind-IL8LA, is the primary measure of this assay. This ratio is written by the following formula:

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

The lead laboratory has proposed that a value of 1.4 corresponds to a positive result for the tested chemical. This value is based on the investigation of the historical data of the lead laboratory. Data management team then used this value through all the phases of validation study. The primary outcome, Ind-IL8LA, is the ratio of 2 arithmetic means as shown in equation.

95% confidence interval (95% CI)

The 95% confidence interval (95% CI) based on the ratio can be estimated to show the precision of this primary outcome measure. The lower limit of the 95% CI ≥ 1 indicates that the nIL8LA with the i-th concentration is significantly greater than that with solvent control. There are several ways to construct the 95% CI. We used the method known as Fieller's theorem in this study. This 95% confidence interval theorem is obtained from the following formula:

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

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

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}, \quad sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2,$$

$$n_{y_i} = 4, \quad \bar{y}_i = (1/n_{y_i}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij}), \quad sd_{y_i}^2 = \{1/(n_{y_i} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2.$$

$t_{0.975(\nu)}$ is 97.5 percentile of the central t distribution with the ν of the degree of freedom, where

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

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

The Inh-GAPLA is a ratio of the averaged GAPLA (SLR-LA) for the repetition of the i-th concentration compared with that with solvent control, and this is written by

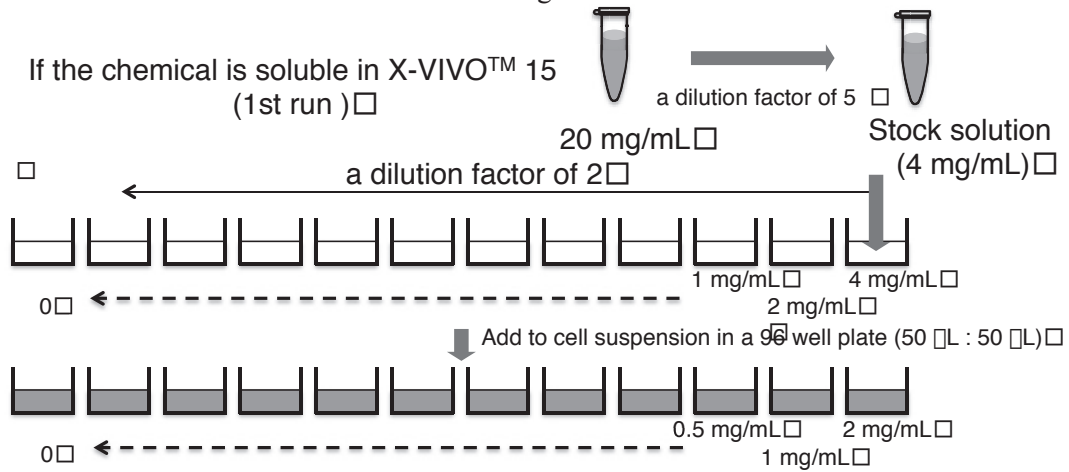
$$\text{Inh-GAPLA}_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j \text{GAPLA}_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j \text{GAPLA}_{0j} \right\}.$$

Since the GAPLA is the denominator of the nIL8LA, an extremely small value causes large variation in the nIL8LA. Therefore, Ind-IL8LA values with an extremely small value of Inh-GAPLA (less than 0.05) might be considered poor precision.

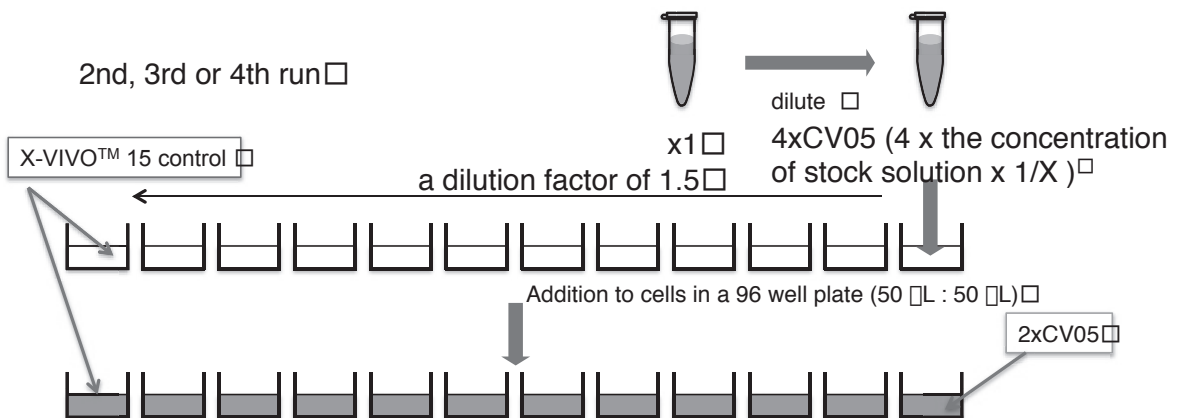
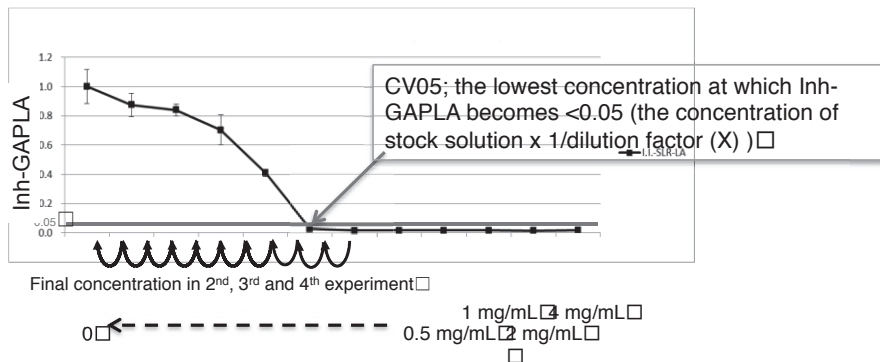
APPENDIX V

THE SCHEME OF THE METHODS TO DISSOLVE CHEMICALS FOR THE IL-8 LUC ASSAY.

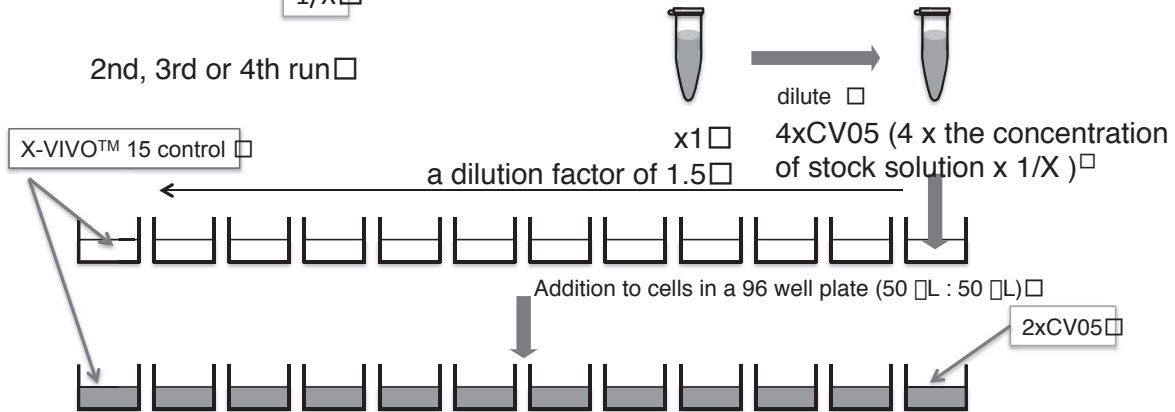
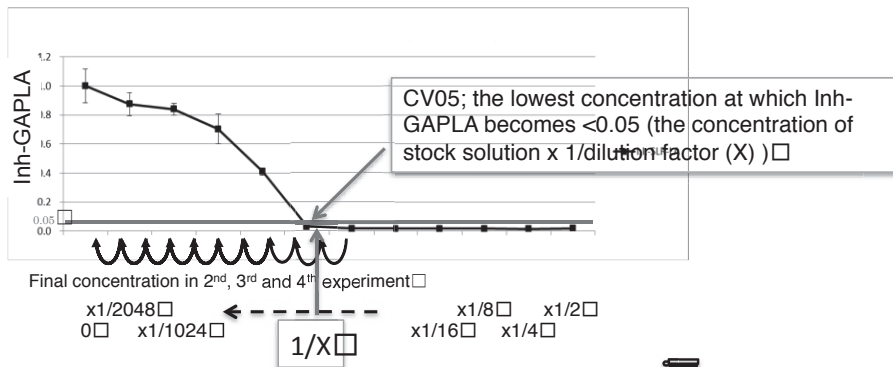
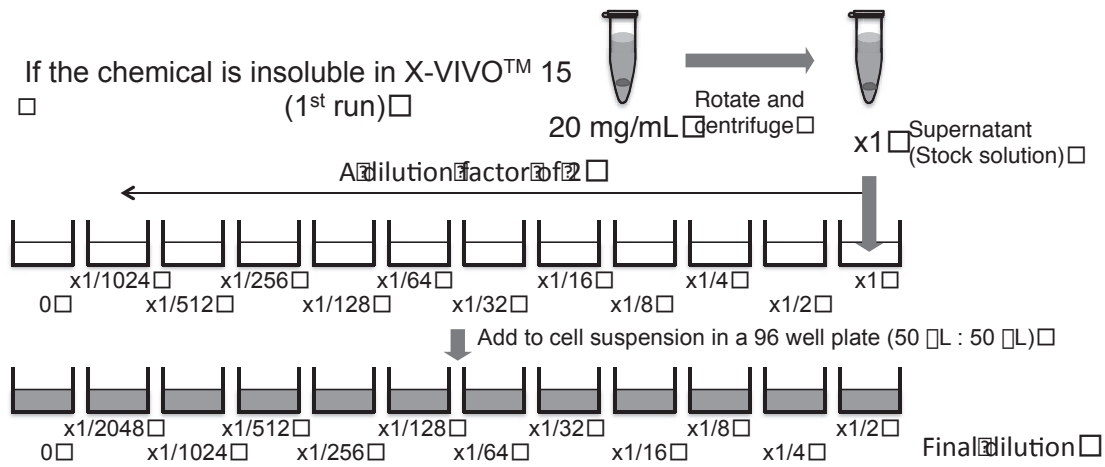
(a) For chemicals dissolved in X-VIVO™ 15 at 20 mg/mL



Determine the highest concentration of the following experiments □



(b) For chemicals insoluble in X-VIVO™ 15 at 20 mg/mL



APPENDIX VI

THE SCHEME OF THE METHOD TO DISSOLVE 4-NBB FOR THE POSITIVE CONTROL OF THE IL-8 LUC ASSAY.

The positive control : 4-NBB (insoluble in X-VIVO™ 15) □

