

評価報告書

皮膚感作性試験代替法

Genomic Allergen Rapid Detection (GARD™)
for assessment of skin sensitisers (GARD™skin)

令和 6 年 7 月 23 日

JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会

JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会

委員長 福山朋季（麻布大学）

委員 安達玲子（国立医薬品食品衛生研究所）＊

大竹利幸（株式会社資生堂）

笠原利彦（富士フイルム株式会社）

河上強志（国立医薬品食品衛生研究所）**

小島 肇（山口東京理科大学/国立医薬品食品衛生研究所）

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）

小島幸一（一般財団法人食品薬品安全センター）

***:令和 6 年 3 月まで**

**** :令和 6 年 4 月から**

用語（略語）集

ADRA: Amino acid Derivative Reactivity Assay

CD: Cluster of Differentiation

DA: Defined Approach

DPRA: Direct Peptide Reactivity Assay

DV: Decision Value

FITC: Fluorescein isothiocyanate

GARDskin: Genomic Allergen Rapid Detection (GARDTM) for assessment of skin sensitisers
(GARDTMskin)

GDAA: GARD Data Analysis Application

GHS: Globally Harmonized System

GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

GPS: Genomic Prediction Signature

h-CLAT: Human Cell Line Activation test

KeratinoSensTM: The ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSensTM test method

LuSens: The ARE-Nrf2 luciferase LuSens test method

NanoString nCounter: NanoString nCounter system (format)

OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development

PE: phycoerythrin

(Q) SAR: Quantitative Structure-Activity Relationship

RCC: Reporter Code Count

SenzaCell: a subclone of the myeloid leukemia cell line MUTZ-3

SenzaGen: SenzaGen AB

SVM: Support Vector Machine

要旨

Genomic Allergen Rapid Detection (GARD™) for assessment of skin sensitisers 法（以下 GARDskin）は、化学物質の安全性評価において重要な評価項目である皮膚感作性を評価する *in vitro* 試験法である。化学物質による皮膚感作が成立する機序として、OECD がまとめた Adverse Outcome Pathway（AOP：有害性発現経路）には、重要な 4 つの Key event（KE）が示されている。GARDskin は、この内の KE3（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などの、樹状細胞の活性化）を検出する系であり、OECD TG 442E に 2022 年に収載された。

GARDskin は、ヒト骨髄性白血病細胞株 MUTZ-3 に由来する細胞株 SenzaCell を用いる *in vitro* の試験法であり、SenzaCell に化学物質を曝露した後、遺伝子発現解析を行い、特異的遺伝子マーカーの発現パターンを定量化する。この定量化された特異的遺伝子の発現情報を、機械学習に基づく予測アルゴリズムを適用することによって、被験物質の感作性を予測するデータ駆動型の新しい手法である。本試験で採用されている標的遺伝子（196 種類）は、CD86 等の共刺激因子、抗酸化／求電子応答エレメント依存性経路等の酸化ストレス因子、Toll-like 受容体やアリアル炭化水素受容体のような異物認識に関連する因子、レチノイン X 受容体依存性経路のような細胞活性化に関連する因子等、皮膚感作反応に関連する因子から構成されている。

本法では SenzaCell に化学物質を曝露した後、フローサイトメトリーによる細胞生存率の確認と、total RNA の単離を行う。ここまでの操作は、比較的容易に実施が可能であると考えられるが、NanoString nCounter システムを用いて 196 遺伝子の発現解析を行う必要がある。本法では、このシステムと専用解析ソフトウェアが必要であり、日本国内での実施は現時点では難しいと考えられる。国外へ外注する場合でも、遺伝子の発現解析に要する費用と時間については情報が少なく把握できていない。また、細胞の使用にはライセンス供与を受けることが必要であり、他の皮膚感作性試験代替法と比較して新規導入の容易な試験系とは言い難い。

GARDskin は水系での反応を必要とする試験系であり、最大終濃度 500 μ M で溶解しない物質や培養液中で容易に加水分解される物質は、陽性判定は可能であるが、陰性の場合は偽陰性の可能性に注意が必要である。溶媒と混合する事で変化がみられる物質および細胞生存率の確認として蛍光色素（PI）を用いたフローサイトメトリー法を使用するため、PI と同じ波長域に強い蛍光を有する被験物質では、細胞傷害性が過大評価される可能性があることに留意する必要がある。プレハプテンやプロハプテンに関しては、本法開発の段階では正しく判定されているが、本細胞の薬物代謝能は情報不足であり、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る。さらに、本法は混合物に関しては適用可能性に関する十分な情報は得られていない。従って、混合物に対する本法の適用については注意が必要である。

本委員会は、本試験法の様々な限界を勘案すると、本試験法単独では皮膚感作性の判定は不十分であると考ええる。それゆえ、証拠の重み付けや他の試験法との組み合わせを推奨する。

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皮膚炎のリスクを動物で予測する OECD 試験法ガイドライン (TG) 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 (Local Lymph Node Assay: LLNA) がある。LLNA には放射性同位体 (RI) の取込量を測定する LLNA-RI 法 (OECD TG 429¹⁾) のほか、RI を用いず Adenosine triphosphate (ATP) 量を測定する LLNA: DA 法 (OECD TG 442A²⁾) や Bromodeoxyuridine (BrdU) 量を測定する LLNA: BrdU-ELISA 法および LLNA: BrdU-FCM 法 (OECD TG 442B³⁾) がある。

EU における欧州化学品規則の一つである Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH) では、安全性評価はコンピューターを用いた定量的構造活性相関 (Quantitative Structure-Activity Relationship: QSAR) モデルや *in vitro* 試験等による代替法が推奨されており、動物実験により安全性が評価された成分を含んだ化粧品の輸入および販売が禁止された (2013 年 3 月全面施行)。そのため、化学物質の皮膚感作性を評価する代替法の開発が進み、動物を用いない多くの代替法が OECD TG として承認されてきている。

一方、これらの皮膚感作性試験代替法はそれぞれ単独では従来の動物を用いる試験法を代替することは不可能とされている^{4,6)}ことから、有害性発現経路 (Adverse Outcome Pathway: AOP) に基づいた組み合わせ (Integrated Approaches to Testing and Assessment: IATA) による確定方式 (defined approach: DA) が、OECD においてガイダンス化された⁷⁾。このガイダンスでは、10 種類以上の組み合わせ方法が提案されたが、これらの方法は、皮膚感作性専門家グループ (Expert Group on Defined Approaches for Skin Sensitisation (EG DASS)) で議論され、テストガイドライン化済みの 3 つの Key Event (KE) を対象とした代替法 (DPRA、KeratinoSensTM、h-CLAT) と QSAR (Derek Nexus あるいは OECD QSAR Toolbox) を組み合わせた下記の 2 つの方法が、組み合わせ方法として採用され、GL 497 に収載された⁸⁾。

- ・ "2 out of 3" (2o3) defined approach : DPRA、KeratinoSensTM、h-CLAT を 1 試験ずつ実施し、3 試験の結果から、多数決で最終判定を実施する。
- ・ "ITS" (Integrated Testing Strategy) : DPRA、h-CLAT および QSAR (Derek Nexus あるいは OECD QSAR Toolbox) の評価結果をスコア化し、総スコアから感作性の有無および感作性強度分類を実施する。

このような仮説駆動型のアプローチとは対照的に、GARDskin は、化学物質の皮膚感作性を予測するために独自に選定したバイオマーカー群を対象とし、その遺伝子発現データに基づき客観的な判定を行うデータ駆動型の試験系である。そのため、結果として得られる遺伝子発現の特徴は、実験的に皮膚感作誘導に関与することが判明した遺伝子やそのプロセスに関与し、皮膚感作を誘導する細胞メカニズムに必要な知見を提供することができる。

ルンド大学で実施された 37 種類のコード化された被験物質の内部バリデーション研究では、

正確度 89%、感度 89%および特異度 88% であることが明らかになった⁹⁾。

この試験法は、2022 年に OECD TG 442E に収載されており、JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会（以下、委員会）が GARDskin 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、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 AOP には、化学物質による皮膚感作が成立するための重要な次の 4 つの Key event (KE) が示されている。

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

KE2: ケラチノサイトにおける炎症性応答および Antioxidant/electrophile response element (ARE) -dependent pathway による遺伝子発現

KE3: 樹状細胞 (Dendritic Cell: 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

皮膚感作の AOP の KE3 に基づく *in vitro* 試験法は、一般的に適応免疫応答に関連する DC の表現型および機能性の変化を測定することで DC の活性化、成熟および遊走に対する物質の影響を評価している。これらの変化には、抗原提示能、MHC クラス I レベルの上昇、および CD54、CD80 および CD86 のような共刺激分子の発現変動が含まれる。GARDskin では、ヒト骨髓性白血病細胞株 MUTZ-3 に由来する細胞株である SenzaCell に化学物質を曝露した後、NanoString nCounter によって遺伝子発現解析を行い、特異的遺伝子マーカーの発現パターンの定量化を実施する。次いで、定量化された特異的遺伝子マーカーの発現情報を、クラウドベースの GARD Data Analysis Application (GDAA) を用いて機械学習に基づく予測アルゴリズムを適用することによって、被験物質の皮膚感作性を、国連 GHS 基準の「区分 1」あるいは「区分に該当しない (Not classified)」に分類する KE3 に基づく試験法である。SenzaCell は GARDskin 技術のライセンス供与後、SenzaGen 社 から入手可能となる。

GARDskin において利用されている遺伝子マーカーのセットは、Genomic Prediction Signature (GPS) と呼ばれ、実験的アプローチによって同定された。すなわち、ここでは、国連 GHS 区分 1 の皮膚感作性既知の参照物質 (N=20) に曝露された SenzaCell から得られた網羅的遺伝子発現データを、非感作性物質 (N=20) を曝露した際のデータと比較して、感作性物質において特異的に発現変動する遺伝子を選定している。

GPS で採用されている標的遺伝子 (196 種類) は、CD86 等の共刺激因子、抗酸化／求電子応答エレメント依存性経路等の酸化ストレス因子、Toll-like 受容体やアリアル炭化水素受容体のような異物認識に関連する因子、レチノイン X 受容体依存性経路のような細胞活性化に関連する因子

等、皮膚感作反応に関連する因子から構成されている。GPSに含まれるバイオマーカーの完全なリストは、GARDskin 試験法の試験ガイドラインの補足文書¹⁰⁾に示されているが、感作性評価の強力な予測因子としての機能が実証されているにもかかわらず、すべての遺伝子が感作性の免疫学的事象と関連するかどうかは、現在のところ不明である。

GARDskin GPS の選択された遺伝子と各 KE との関連性を図 1 に示す。

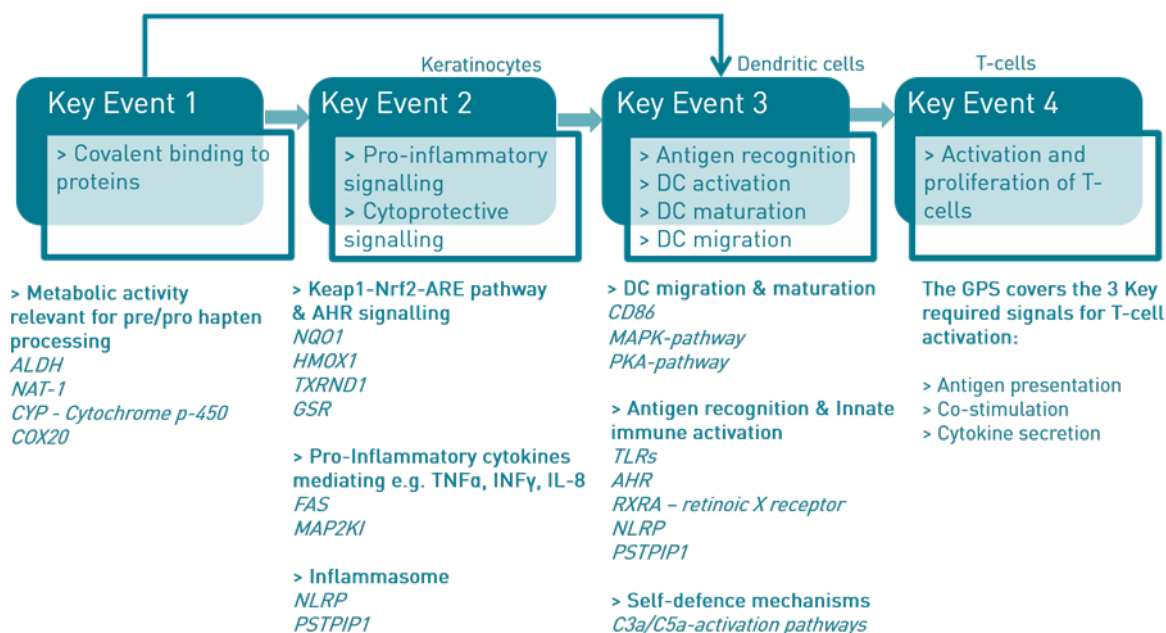


図 1 GARDskin GPS の選択された遺伝子と各 KE との関連性

GARD は、GARDskin^{9, 11, 12)}、国連 GHS の感作強度分類をするための GARDpotency¹³⁾、呼吸器感作性物質の特定のための GARDair¹⁴⁾の 3 つのアプリケーションからなる独自のプラットフォームであるが、本評価書は GARDskin を対象としたものである。

3. 評価手順

GARDskin の試験手順の概略を図 2 に示す。試験に使用する SenzaCell は SenzaGen 社から入手できる。細胞は 3～4 日ごとに継代し維持する。細胞は融解後、継代数として 16 回、または 2 か月間使用できる。試験に使用する細胞は CD1a、CD14、CD34、CD54、CD80、CD86 および HLA-DR の発現と細胞生存率をフローサイトメーターにより評価し、基準を満たしたものを使用しなければならない。GARDskin に使用できる媒体はジメチルスルホキシド (DMSO) と水である。いずれの媒体も適さない場合、十分な科学的根拠が示されれば、DMSO、水以外の媒体の使用や、細胞培養培地に被験物質を直接溶解することも可能であるが、使用する媒体は細胞毒性を誘発せず、使用濃度で感作性物質として判定されてはならない。被験物質は、分子量が明らかな場合は

最大終濃度 500 μ M、分子量が特定されていない被験物質の場合は 100 μ g/mL になるように調製することが推奨されている。最初に、本試験で用いる被験物質の濃度（GARD input 濃度）を決定するために、用量設定試験を実施する。この濃度の決定は、被験物質の媒体への溶解度と細胞毒性に基づいて行われる。細胞生存率は、ヨウ化プロピジウム（PI）により細胞を染色した後、フローサイトメーターによる解析結果から算出する。本試験に用いる被験物質濃度が決定（詳細は Annex I を参照）された後、別バッチの細胞を用いて独立した 3 回の本試験を実施する。各本試験では、フローサイトメーターによる細胞生存率の確認と、total RNA の単離を行う。細胞生存率の基準を満たさなかったサンプル、または total RNA 品質の基準を満たさなかったサンプルは以降の解析には使用せず、本試験をやり直す。3 回の本試験で単離した total RNA は NanoString nCounter を用いて 196 遺伝子の発現解析を行い、以降の解析に必要なファイルを作成する。NanoString nCounter による解析は外注も可能である。196 遺伝子の GDAA（発現解析結果のデータ分析）以降は、SenzaGen 社のサービスを利用する。NanoString nCounter により作成されたデータファイルをクラウドベースのアプリケーションにアップロードすると、データの品質チェックと GARDskin 予測モデルによる被験物質の皮膚感作性判定が行われる。

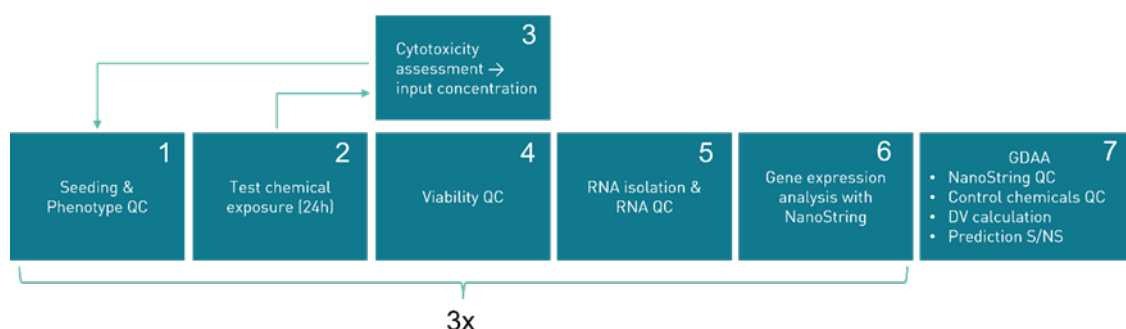


図 2. GARDskin 手順の概略図

4. 正確性¹⁵⁻¹⁷⁾

4-1. 技術移転性

バリデーション参加施設（Burleson 社および Eurofins 社）において、3 種類の化学物質（表 S2-1）を用いてトレーニングが実施された後、5 種類の化学物質（表 S2-2）を用いて技術移転性に関する評価が行われた。技術移転の成功基準は「3 回連続の有効な試験結果が 100%一致し、正しい予測性を示すこと」とされた。

Burleson 社では、1 回目の試験では 1 種類の化学物質で細胞生存率が基準を満たさなかったため、4 回目の試験を追加した。2～4 回目の試験で技術移転性の基準を満たす結果が得られた（表 S2-3）。Eurofins 社では、3 回の連続した試験で技術移転性の基準を満たす結果が得られた（表 S2-4）。これらの結果から、GARDskin は、適切な設備と人員を持つ機関において、適切なトレーニ

ングが行われれば、技術移転可能であることが示された。

4-2. 施設内再現性および施設間再現性

施設内再現性および施設間再現性調査は、SenzaGen 社に加えて 4-1 で技術移転が確認された Burleson 社および Eurofins 社で実施された。28 種類の化学物質（感作性物質 19 種類、非感作性物質 9 種類、表 S2-5）が、次の基準で選択された。

(i)化学反応性および強度分類の多様性

(ii)細胞培養液への溶解度に関する多様性

(iii)皮膚感作性の観点からの多様性

(iv)入手可能性、安定性

(v)予測アルゴリズムの学習に使用した化学物質の数は最小限とする。

本試験で使用した 28 種の化学物質の中に予測アルゴリズムの学習に使用した化学物質が含まれていたが（感作性 6 物質(表 S2-5 No.4, 12, 13, 14, 16, 19)、非感作性 5 物質(表 S2-5 No. 21, 23, 25, 26, 27))、上記の基準を維持するため本試験に使用されることとなった。施設内再現性および施設間再現性の基準は、GARDskin の背景、目的、使用方法や、他の試験法で許容された性能の基準等を考慮し、「施設内および施設間におけるそれぞれの感作性／非感作性判定の一致率が 80% 以上であること」とされた。

4-2-1. 施設内再現性：Burleson 社（表 S2-6）

試験 1 では、溶解度や細胞生存率の問題により 4 種類の化学物質で判定結果が得られず、24 種類の化学物質について判定結果が得られた。試験 2 および試験 3 では、それぞれ 26 種類、25 種類の化学物質について判定結果が得られた。

全体として、感作性物質 19 種類のうち 15 種類について、また非感作性物質 9 種類のうち 7 種類について、3 回の試験で一致した結果が得られた。

感作性／非感作性判定の施設内再現性は、83.3%であり、3 回の試験全てにおいて判定結果が得られた 24 種類の化学物質のうち 20 種類について一貫した判定結果が得られた。

なお、28 物質全体の評価では、溶解度や細胞毒性が原因で判定結果が得られない場合も、3 回の試験結果が同じ原因だった時は、再現性ありと判断した（残りの 2 社も同様に判断した）。その結果、Burleson 社の 28 物質全体の施設内再現性は、78.6%であった。

4-2-2. 施設内再現性：Eurofins 社（表 S2-7）

3 回の試験において、28 種類のうち 27 種類の化学物質で判定結果が得られたが、1 種類の化学物質では、3 回の試験全てにおいて溶解性の問題から判定結果が得られなかった。

感作性／非感作性判定の施設内再現性に関しては、3 回の試験全てにおいて判定結果が得られた 27 種類の化学物質のうち 24 種類について一貫した判定結果が得られ、施設内再現性は 88.9%であった。なお、28 物質全体の評価では 89.2%であった。

4-2-3. 施設内再現性：SenzaGen 社（表 S2-8）

3 回の試験全てにおいて、28 種類全ての化学物質で判定結果が得られ、23 種類の化学物質については一貫した判定結果が得られたことから、感作性／非感作性判定の施設内再現性は 82.1%であった。

4-2-4. 施設内再現性についての結論

3 施設の感作性／非感作性判定の施設内再現性は、それぞれ 83.3%（Burleson 社）、88.9%（Eurofins 社）、および 82.1%（SenzaGen 社）であり、28 物質全体の評価ではそれぞれ 78.6%（Burleson 社）、89.2%（Eurofins 社）、および 82.1%（SenzaGen 社）であった。これは、一部を除き「感作性／非感作性判定の一致率が 80%以上」という基準を満たす結果であった。

なお、本評価に使用された化学物質セット（28 物質）に関し、委員会において予測アルゴリズムの学習に用いられた物質が約 4 割（11 物質）含まれていることによるバイアスを懸念する意見が出されたため、予測アルゴリズムの学習に用いられた物質のみおよびそれらを除いた場合の結果に関しても併せて確認を行った。その結果、該当物質を除いた場合の施設内再現性は、感作性／非感作性判定のみに基づいて算出された場合はそれぞれ 92.3%（Burleson 社）、93.8%（Eurofins 社）、および 82.4%（SenzaGen 社）であり、基準を満たすことが確認された。なお、一部の施設は、予測アルゴリズムの学習に用いられた物質のみの結果が 72.7%と 80%の基準を下回ったが、施設内再現性に対する物質選定の影響はなかったものと考えられた。

4-2-5. 施設間再現性

Burleson 社は 3 種類の化学物質について判定結果を得ることができなかった。Eurofins 社は 1 種類の化学物質について判定結果を得ることができなかったが、3 施設とも判定結果が得られた 25 種類の化学物質のうち 23 種類について一致した判定結果が得られ、施設間再現性は 92.0%であった（表 S2-9）。これは、「感作性／非感作性判定の一致率が 80%以上」という基準を満たす結果であった。

なお、施設間再現性に関しても同様に予測アルゴリズムの学習に用いられた 11 物質を除いた場合の結果に関しても併せて確認した。その結果、該当物質を除いた 14 物質の施設内再現性は有効な試験結果のみに基づき算出され、85.7%であったが、それら 14 物質に判定結果を得ることができなかった 3 物質を加えた 17 物質では 70.6%であった。一方、予測アルゴリズムの学習に用いられた物質のみではいずれの場合も 100%であったことから、施設間再現性は予測アルゴリズムの学習に用いられた物質の影響により過大評価されている可能性が示唆された。

4-3. 正確度、感度および特異度（vs LLNA）

施設内再現性および施設間再現性の評価結果から、各施設および 3 施設全体における GARDskin の LLNA に対する判定結果（正確度、感度、特異度）を、有効な試験結果のみに基づいて算出した（表 S2-10、S2-11）。3 施設全体では、正確度 93.8%、感度 92.7%、特異度 96.0%で

あった（表 1-1）。なお、予測アルゴリズムの学習に用いられた物質を除いた場合では正確度 95.7%、感度 97.3%、特異度 90.0%と同等の結果であったことから（表 1-2）、正確度、感度、特異度の評価への予測アルゴリズムの学習に用いられた物質の影響は無視できると考えられた。

表 1-1 各施設および 3 施設全体の正確度、感度、特異度（vs LLNA）

	Burleson	Eurofins	SenzaGen	3 施設全体
正確度(%)	96.0 (24/25)	96.3 (26/27)	89.3 (25/28)	93.8 (75/80)
感度(%)	94.1 (16/17)	94.7 (18/19)	89.5 (17/19)	92.7 (51/55)
特異度(%)	100.0 (8/8)	100.0 (8/8)	88.9 (8/9)	96.0 (24/25)

表 1-2 正確度、感度、特異度への学習化合物の影響（vs LLNA）

	学習化合物以外	学習化合物のみ
正確度(%)	95.7 (45/47)	90.9 (30/33)
感度(%)	97.3 (36/37)	83.3 (15/18)
特異度(%)	90.0 (9/10)	100.0 (15/15)

また、SenzaGen 社で実施された 40 種類の化学物質を用いた検討結果から算出された正確度は 97.5%、感度は 100.0%、特異度は 93.8%であった（表 S2-12、S2-13）¹⁸⁾。Cosmetics Europe で実施された 56 物質の検討結果から算出された正確度は 87.5%、感度 93.6%、特異度は 55.6%であった¹⁹⁾。56 物質中 52 物質については、h-CLAT の検討結果が報告されており、正確度 86.5%、感度 90.7%、特異度 66.7%であった（表 S2-14、S2-15）。正確度、感度、特異度のこれらの値は、GARDskin が皮膚感作性物質の *in vitro* 試験法として、h-CLAT と同程度の性能を有することを示している。

なお、評価に用いられた物質の中で Ethylene diamine は 3 施設ともに偽陰性の結果となっており、現在の GARD の予測アルゴリズムは本物質および類似の物質に対して誤った結果をもたらす可能性があることに留意する必要がある。

5. 有用性と限界

本試験法は、SenzaGen 社から入手できるヒト骨髓性白血病細胞株 SenzaCell を用いる *in vitro* の試験法であり、細胞株を用いた他の *in vitro* 試験法と同様に、「動物の愛護および管理に関する法律」および 3Rs の精神と合致している。試験の精度に関しても、正確度、感度、特異度とも高い水準にあり、GARDskin が皮膚感作性物質の *in vitro* 試験法として十分に高い性能を有していることが示唆される。

本試験法の実施には、細胞培養設備、フローサイトメーターおよび遺伝子解析設備を保有する必要があるが、細胞培養設備、フローサイトメーターによる細胞生存率の確認、そして細胞からの total RNA 単離までの操作は、既存の皮膚感作性試験代替法と同様に一般的な試験施設において実施可能と考えられる。一方、抽出した total RNA の網羅的解析には、NanoString nCounter とその解析ソフトウェアが必要であり、日本国内での実施は現時点で難しい。日本から海外へ外注す

る場合においても、代理店の有無、サンプルの送付方法、total RNA の網羅的解析に要する費用と時間については情報が少なく把握できていない。また、細胞の使用にはライセンス供与を受けることが必要であり、新規導入の容易な試験系とは言い難い。そのほか、本法と同様に KE3 に対応する h-CLAT では 156 物質²⁰⁾、U-SENSTM では 175 物質²¹⁾、IL-8 Luc assay では 143 物質²²⁾を試験法開発時に用いているのに対して、本法は SVM を用いた予測式によって判定される手法であるが試験法開発時に用いた被験化学物質数が 56 物質と少ないため、幅広い物質群への適用性に懸念がある。

本試験法における有用性の限界として、被験物質の溶解性があげられる。本法は培養細胞を用いた試験法であることから、被験物質を溶解して反応させる必要があるため、溶媒として DMSO 又は水を用い（科学的根拠があれば他の溶媒も使用可能とされている）、試験液中の最大終濃度（500 μ M）で溶解する事が好ましい。最大終濃度 500 μ M で溶解しない物質や培養液中で容易に加水分解される物質に対して、陽性判定は採用できるが、陰性判定の場合は偽陰性の可能性があるので注意が必要である。また、本法で評価に至るまでの細胞生存率の確認として PI を用いたフローサイトメトリー法を使用するため、PI と同じ波長域に強い蛍光を有する被験物質では、細胞傷害性が過大評価される可能性があることに留意する必要がある。プレハプテンやプロハプテンに関しては、本法開発の段階では正しく判定されているが、本細胞の薬物代謝能は情報不足であり、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。

6. 結論

GARDskin は、ヒト骨髄性白血病細胞株 SenzaCell を用いた 196 遺伝子マーカーの相対発現量の解析に基づき、化学物質の皮膚感作性を予測する *in vitro* 試験法であり、感作 AOP における KE3 に対応するデータ駆動型の新しい手法である。

本法は細胞実験と NanoString nCounter による遺伝子の網羅解析を組み合わせた試験法であり、一般的な細胞培養設備の他に、NanoString nCounter の使用が必要であることから、日本国内で本法の全工程を実施可能な施設は現時点ではないと考えられる。さらに、遺伝子発現解析の国外への外注に関する情報が不足しており、SenzaCell の使用に係るライセンス取得が必要であることも考えると、他の皮膚感作性試験代替法と比較して日本国内において新規導入が容易な試験系とは言い難い。

本試験の技術移転性について、5 種の化学物質を用いて 2 機関で検討され、適切な設備と人員を持つ機関において、適切なトレーニングが行われれば技術移転が可能であることが示された。本試験のバリデーション研究は 28 の化学物質（感作性物質 19 種類、非感作性物質 9 種類）を用いて 3 機関で実施された。施設内再現性は 82.1-88.9%、施設間再現性は 92.0-100%であり、いずれも達成基準 80%以上を満たした。LLNA のデータがある 56 種類の化学物質を用いた検討結果から算出された正確度は 87.5%、感度は 93.6%、特異度は 55.6%であった。この 56 物質を見る限り、

本法は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。

GARDskinは水系での反応を必要とする試験系であるため、最大終濃度 500 µM で溶解しない物質や培養液中で容易に加水分解される物質は、陽性判定は採用できるものの、陰性判定の場合は偽陰性の可能性があるので注意が必要である。溶媒と混合する事により変化がみられる物質および細胞生存率の確認として PI を用いたフローサイトメトリー法を使用するため、PI と同じ波長域に強い蛍光を有する被験物質では、細胞傷害性が過大評価される可能性があることに留意する必要がある。プレハプテンやプロハプテンに関しては、本法開発の段階では正しく判定されているが、本細胞の薬物代謝能情報が不足しているため、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、未検討のプレハプテンやプロハプテンについては偽陰性を生じる可能性もある。さらに、本法は混合物に関しては適用可能性に関する十分な情報は得られていない、従って、混合物に対する本法の適用については注意が必要である。

本委員会は、上記の本試験法のような限界を勘案すると、本試験法単独での皮膚感作性の判定は不十分であると考え、証拠の重み付けや他の試験法との組み合わせを推奨する。

引用文献

- 1) OECD (2010). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 429. The Local Lymph Node Assay (LLNA), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: (oecd-ilibrary.org)
- 2) OECD (2010). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442A. The Local Lymph Node Assay: DA, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: (oecd-ilibrary.org)
- 3) OECD (2024). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442B. The Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or -FCM, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: (oecd-ilibrary.org)
- 4) OECD (2024) OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C. *In chemico* skin sensitisation assays addressing the Adverse Outcome Pathway Key Event on Covalent Binding to Proteins. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: (oecd-ilibrary.org)
- 5) OECD (2024). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442D. *In vitro* Skin Sensitisation Assays Addressing the Adverse Outcome Pathway Key Event on Keratinocyte Activation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: (oecd-ilibrary.org)
- 6) OECD (2024). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E. *In vitro* Skin Sensitisation Assays Addressing the Key Event on Activation of Dendritic Cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: (oecd-ilibrary.org)
- 7) 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 sensitization, Annex 1 and Annex 2. Organisation for Economic Cooperation

- and Development, Paris. Available at: (oecd-ilibrary.org)
- 8) OECD (2023) OECD Guideline No. 497. Defined Approaches on Skin Sensitisation. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: (oecd-ilibrary.org)
 - 9) Johansson, H., Rydnert, F., Kühnl J., Schepky, A., Borrebaeck, C., Lindstedt, M. (2014) Genomic allergen rapid detection in-house validation – A proof of concept. *Toxicol. Sci.* 139, 362-370. Doi: 10.1093/toxsci/kfu046.
 - 10) OECD (2022). Supporting document to the Test Guideline for the GARDskin test method. Series on Testing and Assessment No. 357: Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: (oecd-ilibrary.org)
 - 11) Johansson, H., Lindstedt, M., Albrekt, A-S., Borrebaeck, C. (2011) A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests. *BMC Genomics* 12, 399. Doi: 10.1186/1471-2164-12-399.
 - 12) Johansson, H., Albrekt, A-S., Borrebaeck, C., Lindstedt, M., (2013) The GARD assay for assessment of chemical skin sensitizers. *Toxicol. In Vitro* 27, 1163-1169. Doi: 10.1016/j.tiv.2012.05.019
 - 13) Zeller, K. S., Förreryd, A., Lindberg, T., Gradin, R., Chawade, A, Lindstedt, M. (2017) The GARD platform for potency assessment of skin sensitizing chemicals. *ALTEX* 34, 539-559. Doi:10.14573/altex.1701101.
 - 14) Förreryd, A., Johansson, H., Albrekt A-S., Borrebaeck, C., Lindstedt, M. (2015) Prediction of chemical respiratory sensitizers using GARD, a novel in vitro assay based on a genomic biomarker signature. *PloS ONE* 10: e0118808. Doi:10.1371/journal.pone.0118808
 - 15) EURL ECVAM. (2018). Genomic Allergen Rapid Detection (GARD) assay for skin sensitization. Report on the GARDskin validation study. Available at: <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2011-09>
 - 16) Johansson, H., Gradin, R., Johansson, A., Adriaens, E., Edwards, A., Zuckerstatter, V., Jerre, A., Burleson, F., Gehrke, H. and Roggen, E. L. (2019). Validation of the GARDskin Assay for Assessment of Chemical Skin Sensitizers: Ring Trial Results of Predictive Performance and Reproducibility. *Toxicol Sci.* 170, 374-381. Doi: 10.1093/toxsci/kfz108.
 - 17) ESAC opinion on the scientific validity of the GARDskin and GARDpotency test methods. Available at: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC125963>.
 - 18) Förreryd, A., Zeller, K. S., Lindberg, T., Johansson, H., Lindstedt, M. (2016) From genome-wide arrays to tailor-made biomarker readout – Progress towards routine analysis of skin sensitizing chemicals with GARD. *Toxicol In Vitro* 37, 178-188. Doi: 10.1016/j.tiv.2016.09.013.
 - 19) Johansson, H., Gradin, R., Förreryd, A., Agemark, M., Zeller, K., Johansson, A., Larne, O., van Vliet, E., Borrebaeck, C., Lindstedt, M. (2017) Evaluation of the GARD assay in a blind Cosmetics Europe study. *ALTEX* 34, 515-523. Doi: 10.14573/altex.1701121.
 - 20) 皮膚感作性試験評価報告書 human Cell Line Activation Test (h-CLAT) (平成 28 年 12 月 20 日)

- 21) 皮膚感作性試験評価報告書 human Cell Line Activation Test (h-CLAT) (平成 30 年 8 月 30 日)
- 22) 皮膚感作性試験評価報告書 Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay) (令和元年 11 月 1 日)

Annex I

3 試験手順／判定

GARDskin の試験手順および判定は、被験物質を曝露した SenzaCell と呼ばれるヒト骨髄性白血病細胞株を用いて、196 遺伝子のバイオマーカーの発現量を NanoString nCounter で定量化し、GDAA を使用して分析することで、皮膚感作性の有無を判定する。詳細な内容を確認する場合には、OECD TG 442E ¹⁾ Annex 4 および EURL ECVAM GARDTMskin Assay Protocol ²⁾を参照する。

3-1. 細胞の準備

ヒト骨髄性白血病細胞株 SenzaCell は SenzaGen 社から入手できる。細胞は、抗生物質を含まない培地で培養し、無菌条件下で扱う。また、細胞を遠心分離する場合は、2～8℃、300～315 × g、5 分間で行う。細胞は、牛胎児血清（FBS、終濃度 20%）および GM-CSF（終濃度 40 ng/mL）を添加した MEM/Alpha 培地（L-グルタミン、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシドを含む）を用いて増殖させる。GM-CSF を添加した培地は長期保存できないため、GM-CSF は培地を使用する都度添加する。細胞数を計測し、3～4 日ごとに 0.2×10⁶ 細胞/mL の濃度で継代する。細胞は融解後、継代数として 16 回、または 2 か月間使用することが出来る。また、用量設定試験は継代数 4～16、本試験には継代数 6～12 の細胞を使用する必要がある。

3-2. 細胞表現型の品質管理手順と許容基準

試験に使用する細胞の品質管理をするために、被験物質の曝露を行った同じ日に、未処理の細胞の表現型をフローサイトメーターで評価する必要がある。2×10⁵ 個の細胞が入った 6 つの染色サンプルを以下のように準備する（表 S1-1）。染色前に洗浄バッファー（0.5～1% BSA（Cohn fraction V）を含む PBS を 0.2 μm フィルター滅菌したもの）で 2 回細胞を洗浄する。細胞は抗ヒト CD1a、CD14、CD34、CD54、CD80、CD86 および HLA-DR モノクローナル抗体とポリクローナル アイソタイプ コントロール抗体で染色する。さらに、細胞生存率の測定用にヨウ化プロピジウム（PI）50 μg/mL で染色する。

表 S1-1. 表現型品質管理で使用する抗体および PI 染色

サンプル 1	Isotype FITC	Isotype PE
サンプル 2	CD86-FITC	CD54-PE
サンプル 3	HLA-DR-FITC	CD80-PE
サンプル 4	CD34-FITC	CD14-PE
サンプル 5	CD1a-FITC	
サンプル 6	Propidium Iodide (PI)	

*抗体の各ロットによって適切な濃度を検定する必要がある。

染色後、細胞を再度洗浄し、洗浄バッファーに再懸濁する。細胞をフローサイトメーターで解析し、最低 10000 イベントを記録する。解析結果が表 S1-2 に記載された基準を満たすことを確認する。いずれかのマーカーが基準の範囲外である場合、その細胞バッチは試験に用いてはならな

い。

表 S1-2. 表現型品質管理（陽性率）および細胞生存率の基準

陽性率 (%)	
バイオマーカー	
CD86	10-40
CD54	+ (>90)
HLA-DR	+ (>60)
CD80	<10
CD34	+ (35-70)
CD14	+ (5-50)
CD1a	+ (10-60)
細胞生存率 (%)	
PI negative cells (absolute viability)	≥ 84.5

「+」は陽性細胞の存在を示す (>0 %)。完全に陽性の細胞集団は必要ない。括弧内の数値は、開発者の過去のデータに基づいた予想範囲であり、受け入れ基準ではなく変動が予想される。

3-3. 対照群の試験成立基準

各実験では未処理群（細胞培養培地）、陰性対照群（試験媒体）、陽性対照群（*p*-フェニレンジアミン、PPD、CAS RN 106-50-3）の解析が必要である。未処理群は絶対細胞生存率の決定、用量設定試験および本試験における相対細胞生存率の計算、およびデータ解析での正規化で利用される。陰性対照群は実験手順のどの段階でも細胞が活性化されていないことを確認するために、用量設定試験および本試験において 95.5%以上の相対生存率であり、GARDskin の予測モデルによって非感作性物質として判定されなければならない。陽性対照群は、実験に使用される細胞に応答性があり、感作性物質に曝露されると活性化することを確認するために、本試験において 84.5～95.4%の相対生存率であり、GARDskin の予測モデルによって感作性物質として判定されなければならない。

3-4. 被験物質および対照物質の調製

GARDskin に使用できる媒体は、DMSO と水であり、いずれも試験液中の最大終濃度は 0.1% である。十分な科学的根拠が示されれば、DMSO、水以外の媒体の使用や、細胞培養培地に被験物質を直接溶解することも可能である。使用する媒体は細胞毒性を誘発させてはならず、使用濃度で感作性物質として判定されてはならない。

被験物質の最大終濃度は 500 μM で、分子量が不明な被験物質の場合は 100 μg/mL が最大終濃度として推奨されている。通常、被験物質は終濃度の 1000 倍の濃度になるように、適切な媒体で調製する（ストック A）。被験物質のストック A は、細胞に曝露する前にさらに培地で希釈する（ストック B）。500 μM で溶解しない場合には、いずれかの媒体で最高溶解濃度を特定し、その濃度を最高濃度とする。被験物質の安定性に問題がない場合は、加熱（37°C）しても良い。

3-5. 用量設定試験

用量設定試験の目的は本試験に用いる被験物質の濃度（GARD input 濃度）を決定することである。この濃度は、被験物質の溶解度と細胞毒性に基づいて決定される。最大終濃度が 500 μM の場合の用量設定試験の例を図 S1-1 に示す。ストック A を、選択した媒体を用いて 1 mM まで段階希釈する。10 μL のストック A を 990 μL の半完全培地（GM-CSF 未添加の細胞培養培地）に加え、ストック B を調製する。被験物質が半完全培地に溶解しにくい場合は、半完全培地での最高溶解濃度が試験の最高濃度となる。陰性対照は被験物質試験液に含まれる媒体と同じ濃度になるように、半完全培地でストック B を調製する。

培養していた細胞を数え、半完全培地に懸濁し、細胞濃度が 2.2×10^5 細胞/mL になるようにする（被験物質添加後のウェル内の最終細胞濃度は 2×10^5 細胞/mL になる）。細胞懸濁液 1 mL に対し、0.26 μL の GM-CSF を添加する（終濃度 150 $\mu\text{g/mL}$ ）。24 ウェルプレートに 1.8 mL の細胞培養液を播種する。200 μL のストック B を加え、慎重に上下にピペッティングしてよく混ぜる。37°C $\pm$ 1°C、5% $\pm$ 0.5% CO₂ で 24 時間 ($\pm$ 0.5 時間) インキュベートする。

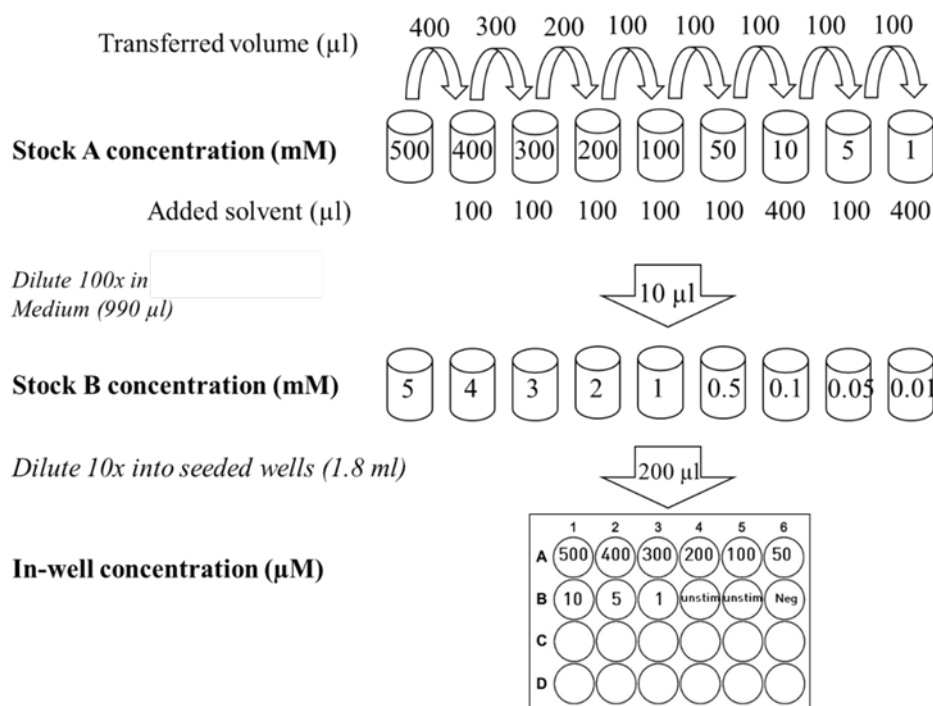


図 S1-1：24 ウェルプレートにおける典型的な用量設定試験の概略

24 時間インキュベートした後、慎重に上下にピペッティングして細胞をよく混ぜる。

各ウェルの懸濁液を 2 つに分け、細胞を洗浄後、洗浄バッファーとヨウ化プロピジウム（PI）50:1 の染色液で染色する。この時、未処理の細胞の 4 つのうち、2 つは染色せずに洗浄バッファーで再懸濁する。染色後、洗浄バッファーで細胞を洗浄し、200 μL の洗浄バッファーで再懸濁し、フローサイトメーターでサンプルを解析する。未処理で染色していない細胞を用いて、PE/FITC

の散布図でPI陽性細胞および陰性細胞のゲートを設定する。全てのサンプルにこのゲートを適用する。各サンプルの絶対生存率を示すPI陰性細胞の割合を記録する。各サンプルの相対生存率は式1に従って計算する。希釈系列の各被験物質濃度および各コントロール群について、2組のサンプルの平均値を計算する。

$$R_v = \frac{V_s}{V_c} \times 100 \quad (\text{式 1})$$

R_v はサンプルの相対生存率 (%)

V_s はサンプルの絶対生存率 (%)

V_c は、2つのPI染色未処理コントロールサンプルの平均絶対生存率 (%)

対照群は次の基準を満たす必要がある。未処理群の平均絶対生存率 $\geq 84.5\%$ および陰性対照群の平均相対生存率 $\geq 95.5\%$ 。

3-6. 本試験の被験物質濃度 (GARD input 濃度)

GARD input 濃度は次のように決定する。

- ① 細胞毒性のある被験物質は平均相対生存率が 84.5%~95.4%となる濃度を選択する。複数の濃度がこの基準を満たす場合、相対生存率が 90%に最も近い濃度を選択する。希釈範囲内の2つのデータポイント間で相対生存率が 95.5%以上から 84.5%未満に低下する場合、境界濃度範囲内の濃度で追加の用量設定試験を実施する必要がある。直線性を仮定できないため、データポイント間の内挿は推奨されない。
- ② 細胞毒性のない被験物質 (相対生存率 $\geq 95.5\%$) は、500 μM の濃度または最高溶解濃度を選択する。
- ③ ストック A またはストック B で溶解性の問題があり、細胞毒性がない被験物質は、他の溶解法があるかどうか、再評価を行う。例えば、加熱の適用や媒体の変更を検討する。

3-7. 本試験

GARD input 濃度が決定されたら、別バッチの細胞を用いて3回の本試験を繰り返す。3回の本試験は並行して実施することも、順次実施することもできるが、被験物質と対照物質は都度調製する必要がある。同じ実験で複数の被験物質を試験する場合、全ての被験物質が同じ媒体に溶解している場合には、対照群を共通にすることが出来る。同じ試験内で異なる被験物質に異なる媒体を使用する場合、実験で使用了各媒体に対応する追加の陰性対照が必要である。図 S1-2 に8つの被験物質を試験する場合の、3回の繰り返し試験の例を示す。この例では全ての被験物質が同じ媒体に溶解していると想定されているため、1つの陰性対照が含まれている。

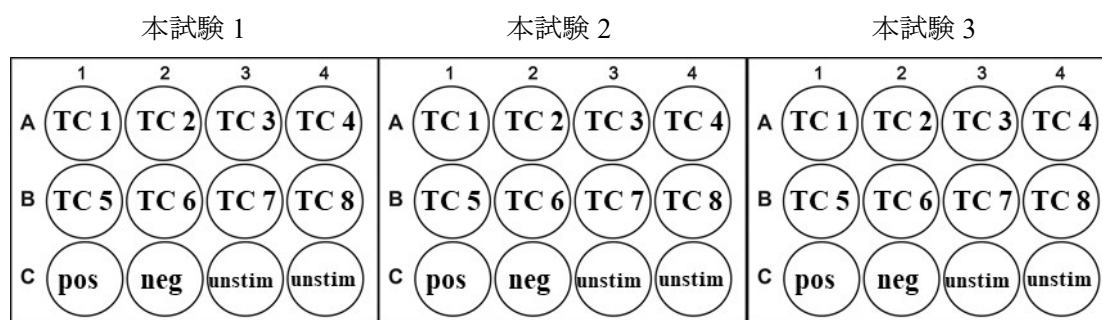


図 S1-2 : ウェルプレートに 8 つの被験物質を配置した例

TC:被験物質、pos: 陽性対照、neg: 陰性対照、unstim : 未処理

本試験の手順は、各被験物質について 1 つの濃度でのみ実施すること以外は用量設定試験と同じである。典型的な手順の要約を以下に示す (図 S1-3)。

適切な媒体を用いて被験物質ストック A およびストック B を調製する。陽性対照と陰性対照は、適切な終濃度になるように調製する。被験物質を添加した後のウェル内細胞濃度が 2×10^5 細胞/mL になるよう、細胞を播種する。37°C、5%CO₂ および加湿条件下で 24 時間インキュベートする。各ウェルの細胞を 1 mL $\times$ 3 本の RNase フリーのマイクロチューブに分け、total RNA の単離に用いる。残りの細胞懸濁液 (< 1 mL) を 2 本のフローサイトメーター解析用のサンプルに分ける。未処理群の 2 番目のウェルからはフローサイトメーター解析用のサンプルを回収する。

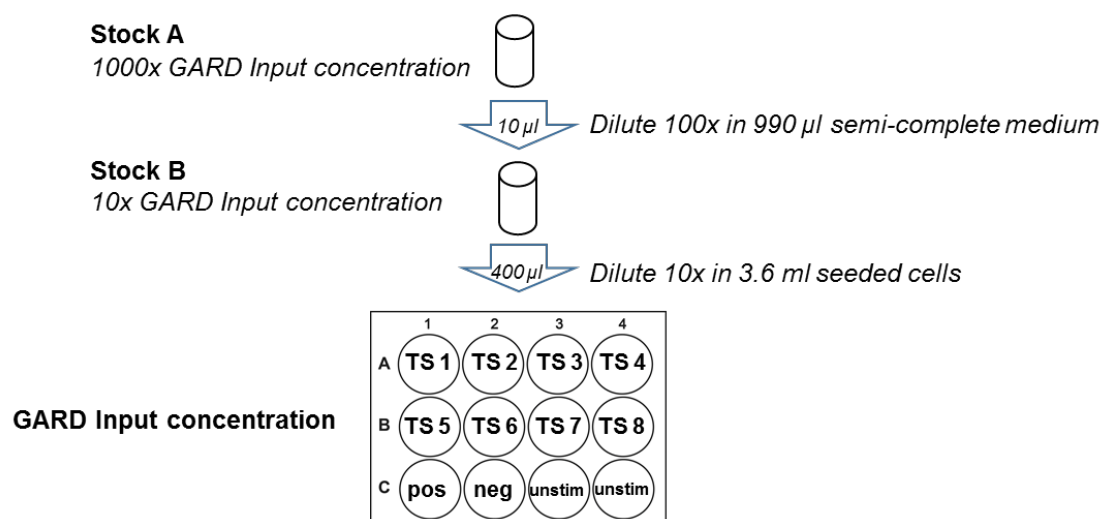


図 S1-3 : 本試験の例

3 回の本試験からそれぞれ 3 本のサンプルが得られるが、total RNA の単離に必要なサンプルは

それぞれから 1 つだけである。残りのサンプルはバックアップ用として冷凍保存 ($\leq -70^{\circ}\text{C}$) しておく。フローサイトメーター解析用のサンプルは用量設定試験と同じように洗浄、染色、解析を行い、表 S1-3 の基準を満たすことを確認する。サンプルが基準を満たさない場合、そのサンプルは以降の試験に使用せず、本試験をやり直す。

表 S1-3. 細胞生存率の基準

被験物質または対照物質	基準 ¹
未処理群	84.5%以上の絶対生存率
陰性対照群	95.5%以上の相対生存率
陽性対照群	相対生存率 84.5% - 95.4%
細胞毒性が予測される被験物質	相対生存率 84.5% - 95.4%
500 μM または最高溶解濃度で試験された被験物質	相対生存率 $\geq 84.5\%$

¹ 未処理群と陰性対照群の基準は、用量設定試験と本実験の両方に適用されるが、陽性対照と被験物質の基準は本実験にのみ適用される。

3-8. RNA の単離

TRIzol など溶解したサンプルから、市販のキット（例えば、Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research, #R2052)）と試薬を使用して mRNA を含む total RNA を単離する。RNA 濃度を定量し、RNA 分析装置（例えば、Agilent Bioanalyzer 2100 または RNA の品質と RNA 濃度を 5~500 ng/ μL で測定できる機器）を使用して各サンプルの RNA 品質を分析する。RNA の濃度は 20 ng/ μL 以上必要である。RNA の品質について、Agilent Bioanalyzer 2100 の場合 RNA Integrity Number(RIN)が 8.0 以上のサンプルは高品質のサンプルとみなされる。

3-9. NanoString nCounter システムを用いた遺伝子発現解析

NanoString nCounter に従い、単離した total RNA を GPS に対応したオリゴヌクレオチド、プローブのセットでハイブリダイゼーションし mRNA の定量化を行う。続いて NanoString nCounter を使用して、自動的にサンプル処理、カートリッジへのプローブ/ターゲットの固定、デジタルデータの取得、カートリッジに固定されたプローブ/ターゲットのカラーコードのカウントが行われる。NanoString nCounter で解析された各サンプル RNA について、レポーターコードカウント (RCC) ファイルが作成される。

3-10. GARD データ分析

RCC ファイルの作成に続いて、データの前処理、正規化、および分析が GDAA ソフトウェアによって実行される。GDAA はクラウドベースのアプリケーションで、Web ブラウザーがインストールされたインターネットに接続されたコンピューターを必要とする。GDAA は GARDskin を使用して予測し、判定結果を生成するために必要な全てのデータ解析を実行する。GDAA では、RCC ファイルの読み取り、アップロードされた各ファイルの NanoString nCounter 品質管理のチェック、遺伝子発現の正規化、参照アライメントによるバッチの調整、最後に GARDskin 予測アルゴリズムを使用して、個々のサンプルを評価し、GARDskin 予測モデルによる被験物質の最終的な分類を行う（図 S1-4）。

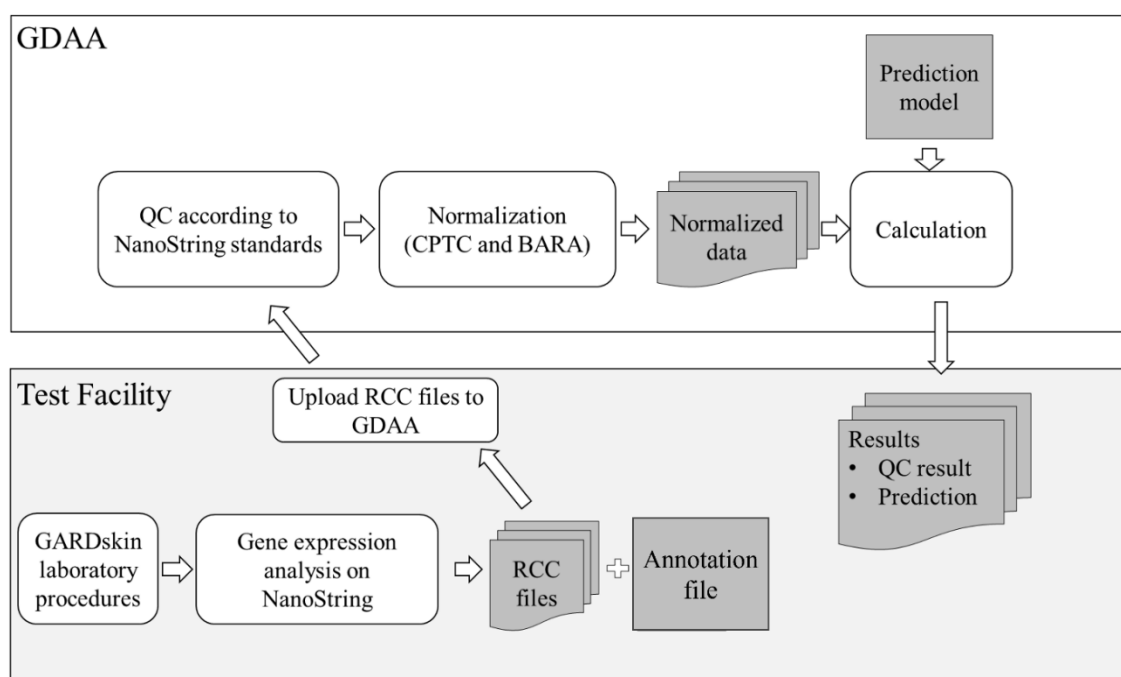


図 S1-4 : 入力ファイルと出力ファイルを含む GDAA ワークフローの概略図

RCC; Reporter Code Count (遺伝子発現の生データ), CPTC; Counts-per-total-counts (RNA 量の正規化), BARA; Batch Adjustment by Reference Alignment (バッチ調整の正規化)

ファイルをアップロードすると、各 RCC ファイルは GDAA で自動的に品質チェックが行われる。表 S1-4 に各基準を示す。これらの基準を満たさない場合、GARDskin でのデータ解析には使用されない。詳細な内容は補足文書³⁾を参照する。

表 S1-4. NanoString nCounter 品質管理の基準

品質指標		基準
画質	画質は、NanoString カートリッジの正常に処理されたセクションの割合を表す。	> 0.75
直線性	直線性は、正のスパイクイン コントロールを使用して推定される R2 値として表される。	> 0.95
検出限界	検出限界は、ポジティブ スパイクイン プローブ POS_E の取得カウントをネガティブ コントロール プローブのカウントと比較することによって評価される。プローブ POS_E は、ノイズ レベルを超えて観察されると予想される最低濃度の正のスパイクイン プローブである。	< POS_E
結合密度	結合密度は、カートリッジの処理中に観察された画像の飽和レベルである。この値は、ロードされたサンプルの量と NanoString ハイブリダイゼーションの効果に依存する。	0.05 ~ 2.25

3-11. 予測モデル

予測アルゴリズムの出力は決定値 (DV) と呼ばれ、式 2 のように計算される。

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

n は変数の数 (遺伝子、つまり GARDskin の場合は 196)、 b は定数 (つまり、SVM の切片)、 w_i は変数 i の重み、 x_i は変数 i の正規化された遺伝子発現値。

3 つの DV は GARDskin 予測モデルに使用され、計算された平均 $DV \geq 0$ の被験物質は感作性物質 (国連 GHS 区分 1) として分類され、平均 $DV < 0$ の被験物質は非感作性物質として分類される。

3-12. 基準のまとめ

以下は、GARDskin で定められている基準の概要である。

- ① すべての実験 (すなわち用量設定試験と 3 回の本試験) は、表現型品質管理の基準 (表 S1-2) に合格した SenzaCell のバッチで実行されている必要がある。
- ② 単離されたすべての RNA サンプルは、細胞生存率の基準 (表 S1-3) を満たした実験に由来する必要がある。これは、実施した 3 回の有効な本試験から得られたすべての被験物質と陽性対照、陰性対照および未処理サンプルに適用される。同様に、用量設定試験は、該当するすべての細胞生存率の基準 (表 S1-3) を満たす必要がある。
- ③ 単離されたすべての RNA サンプルは、NanoString nCounter 品質管理の基準 (表 S1-4) に合格する必要がある。これは、有効な 3 回の本試験から得られたすべての被験物質と陽性対照、陰性対照および未処理サンプルに適用される。
- ④ 最終的な分類は、基準①～③をすべて満たした 3 回の有効な本試験サンプルを使用して

行う必要がある。

- ⑤ 陽性対照と陰性対照は、GARDskin 予測モデルによって、それぞれ感作性物質と非感作性物質として正確に分類される必要がある。

引用文献

- 1) OECD (2024). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E. In vitro Skin Sensitisation Assays Addressing AOP Key Event of Activation of Dendritic Cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: oecd-ilibrary.org
- 2) EURL ECVAM. (2018). Genomic Allergen Rapid Detection (GARD) assay for skin sensitization. Report on the GARDskin validation study. Available at: <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2011-09>
- 3) OECD (2022). Supporting document to the Test Guideline for the GARDskin test method. Series on Testing and Assessment No. 357: Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: oecd-ilibrary.org

Annex II

4. 正確性

4-1. 技術移転性

バリデーション参加機関（Burleson 社および Eurofins 社）のトレーニングは、プロトコルの生物学的システム、RNA 調製（技術的システムの一部）、データ解析と予測に焦点を当てた。NanoString nCounter を用いたエンドポイント測定はリードラボである SenzaGen 社により実施された。トレーニング用の化学物質（表 S2-1、strong sensitizer 1 種類、moderate sensitizer 1 種類、non-sensitizer 1 種類）は、試験成績の再現性が高く取り扱いが容易なものを SenzaGen 社が選択した。

技術移転性の検討では、SenzaGen 社が 5 種類の化学物質を選定した（表 S2-2）。SenzaGen 社は RNA 品質管理および NanoString nCounter を用いた遺伝子発現解析のみに関与し、データ分析と予測は参加機関で実施された。

表 S2-1 トレーニングに使用された化学物質

Benchmark control	S/NS	Cas#	Vehicle	GARD input (μM)	GARD input found at lab. (μM)	Rv90 (Y/N)	Rv90 found at lab. (Y/N)
Hydroxy-ethylacrylate	S	818-61-1	water	100	100	Y	Y
2-aminophenol	S	95-55-6	DMSO	100	100	Y	Y
1-butanol	NS	71-36-3	DMSO	500	500	N	N
DMSO	NS	67-68-5		(0.1%)	(0.1%)	N	N
Medium	NS					N	N

表 S2-2 技術移転性の評価に使用された化学物質

Chemical	Cas#	S/NS	Potency class (LLNA/Human)
DNCB	97-00-7	S	Extreme/1
Resorcinol	108-46-3	S	Moderate/4
Geraniol	106-24-1	S	Weak/4
1-butanol	71-36-3	NS	NS/6
Chlorobenzene	108-90-7	NS	NS/6

表 S2-3 技術移転性の評価の結果：Burleson

Test substance	GARD Prediction Transfer 1	GARD Prediction Transfer 2	GARD Prediction Transfer 3	GARD Prediction Transfer 4
<i>DNCB</i>	<i>No valid</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
<i>Resorcinol</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
<i>Geraniol</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
<i>1-Butanol</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
<i>Chlorobenzene</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>

表 S2-4 技術移転性の評価の結果：Eurofins

Test substance	GARD Prediction Transfer 1	GARD Prediction Transfer 2	GARD Prediction Transfer 3
<i>DNCB</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
<i>Resorcinol</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
<i>Geraniol</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
<i>1-Butanol</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>
<i>Chlorobenzene</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>

4-2. 施設内再現性および施設間再現性

生物学的システム、および技術的システムの中の RNA 分離に関しては、Burleson 社、Eurofins 社、SenzaGen 社のそれぞれが実施した。3 機関とも、生物学的システムの基準を満たす RNA 試料を取得した。

生物学的システムの基準は「1 試験あたり 3 回、有効な RNA 試料（技術的システムの受入基準に適合する試料）を取得すること」とされた。

NanoString nCounter による解析に関しては、SenzaGen 社は自社で実施し、Burleson 社と Eurofins 社はそれぞれ Covance と KIGene にて実施した。得られたデータについて、SenzaGen 社、Burleson 社および Eurofins 社にて、データ分析と予測が行われた。

技術的システムの基準は「1 試験あたり 3 回の RNA 試料全てで NanoString nCounter による解析が実施されること」とされた。

データ分析の基準は「NanoString nCounter による完全な解析後、全ての被験物質について決定値（DV）が付与されること」とされた。

表 S2-5 施設内および施設間再現性の評価に使用された 28 種類の化学物質

No	Sensitizer	Chemical name	CAS RN	Human potency category	LLNA potency category	DASS
1	S	4-Nitrobenzyl bromide	100-11-8	na	Extreme	1
2	S	2-Bromo-2-glutaronitrile	35691-65-7	2	Strong	1
3	S	Cinnamal	104-55-2	2	Moderate	1
4*	S	Formaldehyde	50-00-0	2	Strong	1
5	S	Lauryl gallate	1166-52-5	2	Strong	1
6	S	4-(Methylamino)phenol sulphate	55-55-0	3	Strong	1
7	S	Methylisothiazolinone	2682-20-4	1	Strong	1
8	S	Propyl gallate	121-79-9	2	Strong	1
9	S	Toluene diamine sulphate	615-50-9	2	Strong	1
10	S	Diethyl maleate	141-05-9	2	Moderate	1
11	S	3-Dimethylaminopropylamine	109-55-7	2	Moderate	1
12*	S	Ethylene diamine	107-15-3	3	Moderate	1
13*	S	Isoeugenol	97-54-1	2	Moderate	1
14*	S	2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	3	Moderate	1
15	S	Benzyl benzoate	120-51-4	5	Weak	NA
16*	S	Cinnamyl alcohol	104-54-1	3	Weak	1
17	S	Citral	5392-40-5	3	Weak	1
18	S	Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	4	Weak	1
19*	S	Eugenol	97-53-0	3	Weak	1
20	NS	Dextran	9004-54-0	6	NS	-
21*	NS	Glycerol	56-81-5	6	NS	0
22	NS	Hexane	110-54-3	6	NS	0
23*	NS	Isopropanol	67-63-0	5	NS	0
24	NS	Kanamycin	70560-51-9	4	NS	0
25*	NS	Lactic acid	50-21-5	6	NS	0
26*	NS	Propylene glycol	57-55-6	5	NS	0
27*	NS	Salicylic acid	69-72-7	6	Weak	0
28	NS	Vanillin	121-33-5	5	NS	0

S: sensitizer. NS: non-sensitizer. na: not available. DASS: DA_BR_2o3_HighConf_calls. NA: not applicable.

*予測アルゴリズムの学習に使用された物質

4-2-1. 施設内再現性：Burleson 社（表 S2-6）

数種類の物質で細胞生存率に問題があり、GARD input 濃度を特定することが困難であったため、バリデーションマネジメントグループは試験開発者と協議の上、用量設定試験を最大 5 回実施することを許可した。これは、GARD input finder モジュールに関する GARDskin 研究計画（セクション 4.2.4.）に準拠している。

試験 1 では、24 種類の化学物質について判定結果が得られた。Dextran (No.20) は十分に溶解していなかった。2-Bromo-2-glutaronitrile (No.2)、4-(Methylamino)phenol sulphate (No.6)、および Citral (No.17) は、細胞生存率の基準に適合しなかった。2-Bromo-2-glutaronitrile (No.2)、4-(Methylamino)phenol sulphate (No.6) では溶解度が低いため GARD input 濃度の再現性が低かったため、Citral (No.17) では自家蛍光が FACS 分析に干渉するため、基準に適合しなかったと考えられた。

試験 2 では、26 種類の化学物質について判定結果が得られた。Dextran (No.20) および Citral

(No.17) では試験 1 と同様に判定結果が得られなかった。

試験 3 では、25 種類の化学物質について判定結果が得られた。Dextran (No.20)、2-Bromo-2-glutaronitrile (No.2)、および Citral (No.17) では試験 1 と同様に判定結果が得られなかった。

全体として (有効でないデータも含めて)、19 種類の皮膚感作性物質のうち 15 種類について 3 回の試験で一致した結果が得られたが、Citral では採用できる結果は得られなかった。9 種類の非感作性物質のうち 7 種類について 3 回の試験で一致した結果が得られたが、Dextran (No.20) では溶解性に問題があった。

また、試験 1 と試験 2 (78.6%)、試験 1 と試験 3 (82.1%) の一致率は、試験 2 と試験 3 (96.4%) の一致率を下回っていた。これは、試験 1 の終了後、キットメーカーが RNA 抽出キットを変更したため、あるいは実験担当者の経験値が上がったためと思われる。

表 S2-6 施設内再現性の評価の結果：Burleson 社

Chemical	Prediction			WLR Agreement
	Exp 1	Exp 2	Exp 3	
1	S	S	S	Yes
2	Not valid ^a	S	Not valid ^a	No
3	S	S	S	Yes
4	S	S	S	Yes
5	S	S	S	Yes
6	Not valid ^a	S	S	No
7	S	S	S	Yes
8	S	S	S	Yes
9	S	S	S	Yes
10	S	S	S	Yes
11	S	S	S	Yes
12	S	NS	NS	No
13	S	S	S	Yes
14	S	S	S	Yes
15	NS	S	S	No
16	S	S	S	Yes
17	Not valid ^a	Not valid ^a	Not valid ^a	Yes
18	S	S	S	Yes
19	S	S	S	Yes
20	Solubility issues	Solubility issues	Solubility issues	Yes
21	NS	NS	NS	Yes
22	NS	NS	NS	Yes
23	NS	NS	NS	Yes
24	NS	NS	NS	Yes
25	S	NS	NS	No
26	S	NS	NS	No
27	NS	NS	NS	Yes
28	NS	NS	NS	Yes
Positive control	S	S	S	
Negative control	NS	NS	NS	
WLR Overall				78.6% (22/28)
WLR Exp 1 & 2				78.6% (22/28)
WLR Exp 1 & 3				82.1% (23/28)
WLR Exp 2 & 3				96.4% (27/28)
WLR (S/NS)				83.3% (20/24)

^a: Not compliant with cell viability acceptance criteria

4-2-2. 施設内再現性：Eurofins 社（表 S2-7）

Dextran (No.20) は十分に溶解していなかった。試験 2 では、2-Bromo-2-glutaronitrile (No.2)、Formaldehyde (No.4)、および Citral (No.17)について、試験 3 では、2-Bromo-2-glutaronitrile (No.2)、4-(Methylamino)phenol sulphate (No.6)、および Citral (No.17)、について、細胞生存率に問題があり GARD input 濃度を特定することが困難であったため、Burleson 社の場合と同様に、GARD input 濃度特定試験を最大 5 回実施することが許可された。Eurofins 社は、2-Bromo-2-glutaronitrile (No.2)、Formaldehyde (No.4)、4-(Methylamino)phenol sulphate (No.6)では細胞の生存率曲線の傾きが大きい
ため、より狭い希釈範囲で GARD input 試験を実施することにより、正確に濃度を特定できると報告している。

28 種類のうち 25 種類の化学物質で一致した結果が得られ、全体の再現性は 89.2%となった。しかし Dextran (No.20) では溶解性の問題から判定結果は得られなかった。試験 1 と試験 2、試験 1 と試験 3、試験 2 と試験 3 のどの場合も、92.6%の再現性が得られた。

表 S2-7 施設内再現性の評価の結果：Eurofins 社

Chemical	Prediction			WLR Agreement
	Exp 1	Exp 2	Exp 3	
1	S	S	S	Yes
2	S	S	S	Yes
3	S	S	S	Yes
4	S	S	S	Yes
5	S	S	S	Yes
6	S	S	S	Yes
7	S	S	S	Yes
8	S	S	S	Yes
9	S	S	S	Yes
10	S	S	S	Yes
11	S	S	S	Yes
12	NS	NS	NS	Yes
13	S	S	S	Yes
14	S	S	S	Yes
15	S	NS	S	No
16	S	S	S	Yes
17	S	S	S	Yes
18	S	S	S	Yes
19	S	S	S	Yes
20	Solubility issues	Solubility issues	Solubility issues	Solubility issues
21	NS	NS	NS	Yes
22	NS	NS	NS	Yes
23	NS	NS	S	No
24	NS	NS	NS	Yes
25	NS	NS	NS	Yes
26	S	NS	NS	No
27	NS	NS	NS	Yes
28	NS	NS	NS	Yes
Positive control	S	S	S	
Negative control	NS	NS	NS	
WLR Overall				89.2% (25/28)
WLR Exp 1 & 2				92.9% (26/28)
WLR Exp 1 & 3				92.9% (26/28)
WLR Exp 2 & 3				92.9% (26/28)
WLR (S/NS)				88.9%(24/27)

4-2-3. 施設内再現性：SenzaGen 社（表 S2-8）

Dextran（No 20）を溶解可能であったが、試験 2、3 では、高濃度では溶液が高粘度となり沈殿物が生じたため、試験濃度は 10 μ M（試験 2）、20 μ M（試験 3）とした。2-Bromo-2-glutaronitrile（No.2）と Citral（No.17）について、細胞生存率に問題があり GARD input 濃度を特定することが困難であったため、Burleson 社の場合と同様に、GARD input 濃度特定試験の追加が必要であった。

28 種類のうち 23 種類の化学物質について一致した結果が得られ、全体の再現性は 82.1%となった。また、試験 1 と試験 3 の再現性（92.9%）は、試験 2 と試験 3 の再現性（89.3%）と類似しており、試験 1 と試験 2 の再現性（82.1%）はやや低かった。RNA 抽出キットの改良や細胞培養経験の影響の可能性が考えられる。

表 S2-8 施設内再現性の評価の結果：SenzaGen 社

Chemical	Prediction			WLR Agreement
	Exp 1	Exp 2	Exp 3	
1	S	S	S	Yes
2	S	S	S	Yes
3	S	S	S	Yes
4	S	S	S	Yes
5	S	S	S	Yes
6	S	S	S	Yes
7	S	S	S	Yes
8	S	S	S	Yes
9	S	S	S	Yes
10	S	S	S	Yes
11	S	S	S	Yes
12	NS	NS	NS	Yes
13	S	S	S	Yes
14	NS	S	S	No
15	S	NS	NS	No
16	S	S	S	Yes
17	S	S	S	Yes
18	S	S	S	Yes
19	S	S	S	Yes
20	NS	NS	NS	Yes
21	NS	NS	NS	Yes
22	NS	NS	NS	Yes
23	NS	NS	NS	Yes
24	NS	S	NS	No
25	NS	NS	NS	Yes
26	NS	NS	NS	Yes
27	NS	S	NS	No
28	S	NS	S	No
Positive control	S	S	S	
Negative control	NS	NS	NS	
WLR Overall				82.1% (23/28)
WLR Exp 1 & 2				82.1% (23/28)
WLR Exp 1 & 3				92.9% (26/28)
WLR Exp 2 & 3				89.3% (25/28)
WLR /S/NS				82.1% (23/28)

4-2-5. 施設間再現性

Burleson 社は、2-Bromo-2-glutaronitrile (No.2)については 2 回の試験で、Citral (No.17)および Dextran (No.20) については 3 回の試験で、判定結果を得ることができなかった。Eurofins 社は、Dextran (No.20) について 3 回の試験で判定結果を得ることができなかった。

表 S2-9 施設間再現性試験における各施設の判定結果

Chemical	In vivo	SenzaGen	Eurofins	Burleson	Agree	SenzaGen versus Eurofins	SenzaGen versus Burleson	Eurofins versus Burleson
1	S	S	S	S	Yes	Yes	Yes	Yes
2	S	S	S	IC ^a	IC ^a	Yes	IC ^a	IC ^a
3	S	S	S	S	Yes	Yes	Yes	Yes
4	S	S	S	S	Yes	Yes	Yes	Yes
5	S	S	S	S	Yes	Yes	Yes	Yes
6	S	S	S	S	Yes	Yes	Yes	Yes
7	S	S	S	S	Yes	Yes	Yes	Yes
8	S	S	S	S	Yes	Yes	Yes	Yes
9	S	S	S	S	Yes	Yes	Yes	Yes
10	S	S	S	S	Yes	Yes	Yes	Yes
11	S	S	S	S	Yes	Yes	Yes	Yes
12	S	NS	NS	NS	Yes	Yes	Yes	Yes
13	S	S	S	S	Yes	Yes	Yes	Yes
14	S	S	S	S	Yes	Yes	Yes	Yes
15	S	NS	S	S	No	No	No	Yes
16	S	S	S	S	Yes	Yes	Yes	Yes
17	S	S	S	IC ^a	IC ^a	Yes	IC ^a	IC ^a
18	S	S	S	S	Yes	Yes	Yes	Yes
19	S	S	S	S	Yes	Yes	Yes	Yes
20	NS	NS	Solubility issues	Solubility issues	IC ^a	IC ^a	IC ^a	IC ^a
21	NS	NS	NS	NS	Yes	Yes	Yes	Yes
22	NS	NS	NS	NS	Yes	Yes	Yes	Yes
23	NS	NS	NS	NS	Yes	Yes	Yes	Yes
24	NS	NS	NS	NS	Yes	Yes	Yes	Yes
25	NS	NS	NS	NS	Yes	Yes	Yes	Yes
26	NS	NS	NS	NS	Yes	Yes	Yes	Yes
27	NS	NS	NS	NS	Yes	Yes	Yes	Yes
28	NS	S	NS	NS	No	No	No	Yes
Concordance Overall					82.1% (23/28)	89.3% (25/28)	82.1% (23/28)	92.9% (26/28)
Concordance S/NS					92.0% (23/25)	95.6% (25/27)	92.0% (23/25)	100.0% (25/25)

^a Inconclusive results

4-3. 正確度（感度および特異度）

表 S2-10 バリデーション試験における各施設の感作性判定結果

Reference result	Burleson (17+8)		Eurofins (19+8)		SenzaGen (19+9)	
	S	NS	S	NS	S	NS
S	16	1	18	1	17	2
NS	0	8	0	8	1	8
Total	16	9	18	9	18	10
Accuracy	96.0		96.3		89.3	
Sensitivity	94.1		94.7		89.5	
Specificity	100.0		100.0		88.9	

表 S2-11 バリデーション試験における3施設の感作性判定結果のまとめ

Reference result	Cumulative	
	S	NS
S (55)	51	4
NS (25)	1	24
Total	52	28
Accuracy	93.8	
Sensitivity	92.7	
Specificity	96.0	

表 S2-12 SenzaGen 社での検討に使用された 40 種類の化学物質

No	Sensitizer	Chemical name	CAS RN	GARD Prediction
1	S	2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	S
2	S	2-Aminophenol	95-55-6	S
3	S	2-Hydroxyethyl acrylate	818-61-1	S
4	S	Geraniol	106-24-1	S
5*	S	Isoeugenol	97-54-1	S
6	S	p-Phenylenediamine	106-50-3	S
7	S	Resorcinol	108-46-3	S
8	S	2-Nitro-1,4-phenylenediamine	5307-14-2	S
9*	S	4-Nitrobenzyl bromide	100-11-8	S
10	S	7-Hydroxycitronellal	107-75-5	S
11	S	Benzalkonium chloride	63449-41-2	S
12*	S	Diethyl maleate	141-05-9	S
13	S	Diphenylcyclopropenone	886-38-4	S
14	S	Ethyl acrylate	140-88-5	S
15	S	Hydroquinone	123-31-9	S
16*	S	Lauryl gallate	1166-52-5	S
17	S	Phenylacetaldehyde	122-78-1	S
18	S	Tetramethylthiuram disulfide	137-26-8	S
19	S	2,4-Dinitrofluorobenzene	70-34-8	S
20	S	3-Methylcatechol	488-17-5	S
21	S	Butyl glycidyl ether	2426-08-6	S
22	S	Diethylthiocarbamyl benzothiazole sulfide	95-30-7	S
23	S	Dimethylthiocarbamyl benzothiazole sulfide	3432-25-5	S
24	S	Lyrar	31906-04-4	S
25	NS	1-Butanol	71-36-3	NS
26	NS	Benzaldehyde	100-52-7	NS
27	NS	Chlorobenzene	108-90-7	NS
28	NS	Dimethyl sulfoxide	67-68-5	NS
29	NS	Dimethyl isophthalate	1459-93-4	NS
30*	NS	Hexane	110-54-3	NS
31*	NS	Lactic acid	50-21-5	NS
32	NS	Menthol	89-78-1	NS
33	NS	Methyl salicylate	119-36-8	NS
34	NS	Saccharin	81-07-2	NS
35*	NS	Salicylic acid	69-72-7	NS
36	NS	Sodium dodecyl sulphate	151-21-3	S
37	NS	Xylene	1330-20-7	NS
38	NS	1-Bromobutane	109-65-9	NS
39	NS	Benzoic acid	65-85-0	NS
40	NS	Citric acid	77-92-9	NS

*バリデーションにおいて使用された物質 (7物質)

表 S2-13 SenzaGen 社における GARD を用いた 40 種類の化学物質の感作性判定結果

Reference result	Historical		Reference result	Historical	
	S	NS		S	NS
S (24)	24	0	S (24)	24	0
NS (16)	1	15	NS (16)	1	15
Total	25	15	Total	25	15
Accuracy	97.5		Accuracy	97.5	
Sensitivity	100		Sensitivity	100	
Specificity	93.8		Specificity	93.8	

表 S2-14 Cosmetics Europe での検討に使用された化学物質

No	Substance ID	CAS	LLNA LLNA.GHS.BIN	h-CLAT hCLAT.Call_IR_ VSB_R_logKow	GARD Prediction
<i>Sensitizers</i>					
1	1,4-phenylenediamine	106-50-3	1	1	S
2	Tetrachlorosalicylanilide	1154-59-2	1	Bp	S
3	Dimethyl fumarate	624-49-7	1	1	S
4	2-aminophenol	95-55-6	1	1	S
5	2-Nitro-1,4-phenylenediamine	5307-14-2	1	Bp	S
6	Glutaraldehyde (act. 50%)	111-30-8	1	1	S
7	Methyl heptine carbonate	111-12-6	1	1	S
8*	Propyl gallate	121-79-9	1	1	S
9*	Toluene diamine sulphate	615-50-9	1	1	S
10	Glyoxal (act. 40%)	107-22-2	1	Bp	S
11*	Isoeugenol	97-54-1	1	0	S
12	Benzoyl peroxide	94-36-0	1	Bn	NS
13	Bisphenol A-diglycidyl ether	1675-54-3	1	Bp	S
14	Iodopropynyl butylcarbamate	55406-53-6	1	1	S
15	1,2-Benzisothiazolin-3-one	2634-33-5	1	1	S
16*	3-dimethylaminopropylamine	109-55-7	1	1	S
17*	Ethylene diamine	107-15-3	1	Bp	S
18	Farnesol	4602-84-0	1	1	S
19	Abietic acid	514-10-3	1	Inconclusive	S
20	Butyl glycidyl ether	2426-08-06	1	0	S
21*	Cinnamic alcohol	104-54-1	1	1	S
22*	Citral	5392-40-5	1	1	S
23*	Eugenol	97-53-0	1	1	S
24	Imidazolidinyl urea	39236-46-9	1	1	S
25	Penicillin G	61-33-6	1	1	NS
26	5-methyl-2,3-hexanedione	13706-86-0	1	Bp	S
27	Resorcinol	108-46-3	1	1	S
28	Amylcinnamyl alcohol	101-85-9	1	1	S
29	Aniline	62-53-3	1	1	S
30	Geraniol	106-24-1	1	Bp	S
31	Lillial	80-54-6	1	Bp	S
32	Linalool	78-70-6	1	1	S
33	Amyl cinnamic aldehyde	122-40-7	1	1	S
34	Carvone	6485-40-1	1	1	S
35	Anisyl alcohol	105-13-5	1	Bp	S
36	Benzyl salicylate	118-58-1	1	0	S
37	Limonene	5989-27-5	1	1	S
38	Hexyl cinnamic aldehyde	101-86-0	1	Inconclusive	S
39*	Benzyl benzoate	120-51-4	1	Inconclusive	S
40	Citronellol	106-22-9	1	1	S
41	Pentachlorophenol	87-86-5	1	Bp	S
42	Pyridine	110-86-1	1	Bp	S
43	Tocopherol	59-02-9	1	Inconclusive	S
44*	Formaldehyde (act.. 37%)	50-00-0	1	1	S
45	Chlorpromazine	50-53-3	1	1	S
46	Hexyl salicylate	6259-76-3	1	1	NS
47	Anethole	104-46-1	1	1	S
<i>Non-sensitizers</i>					
1*	Kanamycin	70560-51-9	NC	0	S
2*	Isopropanol	67-63-0	NC	Bn	NS
3*	Propylene glycol	57-55-6	NC	0	NS
4	Triethanolamine	102-71-6	NC	1	S
5*	Vanillin	121-33-5	NC	0	NS
6*	Glycerol/Glycerin	56-81-5	NC	0	NS
7	Octanoic acid	124-07-2	NC	1	NS
8	Diethyl phthalate	84-66-2	NC	Bp	S
9	Diethyl toluamide	134-62-3	NC	0	S

使用された 72 物質のうち DASS LLNA binary GHS classification (LLNA.GHS.BIN)データがある 56 物質の結果を抽出した。
Sensitizers/Non-Sensitizers の分類は LLNA.GHS.BIN に従う。*バリデーションにおいて使用された物質 (15 物質)。

For LLNA, 1: sensitizer, NC: not classified. For h-CLAT, 1: positive, 0: negative, Bp: borderline positive, Bn: borderline negative. For GARD, S: sensitizer, NS: non-sensitizer.

表 S2-15 GARD あるいは h-CLAT を用いた Cosmetics Europe での検討に使用された化合物の感作性判定結果

Reference result	GARD		Reference result	h-CLAT	
	S	NS		S	NS
S (47)	44	3	S (43)	39	4
NS (9)	4	5	NS (9)	3	6
Total	48	8	Total	42	10
Accuracy	87.5		Accuracy	86.5	
Sensitivity	93.6		Sensitivity	90.7	
Specificity	55.6		Specificity	66.7	

※h-CLAT に関しては Inconclusive の 4 物質を除いた 52 物質で評価した。