

# 評価会議報告書

human Cell Line Activation Test (h-CLAT)

JaCVAM 評価会議

平成 28 年（2016 年）12 月 20 日

## JaCVAM 評価会議

- 大野 泰雄 (運営委員会推薦) : 座長
- 飯塚 尚文 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
- 五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部)
- 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)
- 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)
- 篠田 和俊 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
- 杉山真理子 (日本化粧品工業連合会)
- 仲井 俊司 (日本化学工業協会)
- 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 安全性生物試験研究センター)
- 沼澤 聡 (日本毒性学会)
- 森田 健 (日本環境変異原学会)
- 横関 博雄 (日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会)

任期：平成 28 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日

human Cell Line Activation Test (h-CLAT) は、多くの皮膚感作性物質が樹状細胞を活性化することを利用し、樹状細胞のモデルのヒト単球系培養細胞 THP-1 細胞に被験物質を曝露したときの細胞表面分子 CD86 および CD54 の発現量を測定することにより、皮膚感作性の有無を判定する試験法である。

h-CLAT については、European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM) によるバリデーション研究が実施され<sup>1)</sup>、EURL ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) による第三者評価を受けた<sup>2)</sup>。2016年7月には、Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) 試験法ガイドライン (Test Guideline: TG) 442E として承認された<sup>3)</sup>。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 human Cell Line Activation Test (h-CLAT)」<sup>4)</sup>を用いて、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： human Cell Line Activation Test (h-CLAT)

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 [Local Lymph Node Assay : LLNA (OECD TG429)、LLNA : DA (OECD TG442A)、LLNA : BrdU-ELISA (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である THP-1 細胞を用い、被験物質が THP-1 細胞を活性化する能力を評価する。THP-1 細胞に被験物質を添加して 24 時間培養した後、fluorescein isothiocyanate (FITC) で蛍光標識した CD86 および CD54 の特異抗体、および propidium iodide (PI) を用いて細胞を染色し、フローサイトメトリーにより細胞表面分子 CD86 及び CD54 の発現量、並びに細胞生存率を測定する。被験物質で処理したときの CD86 および CD54 それぞれの平均蛍光強度を、溶媒のみを添加したコントロールの蛍光強度と比較し、相対蛍光強度を算出する。

## 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、EURL ECVAM によるバリデーション研究<sup>1)</sup>とそれに続く ESAC による第三者評価により、実験動物を用いた皮膚感作性試験の代替法として科学的に妥当であると報告されており<sup>2)</sup>、2016年7月に OECD 試験法ガイドラインとして承認されている<sup>3)</sup>。JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会では、現在まで公開されている情報<sup>2,3,5-8)</sup>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た。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反応を指標にしたもので、活性化の際に認められる細胞表面分子の発現亢進を測定するという点で原理的にも妥当である。

### 3. 本試験法の有用性と適用限界

本試験法は、ヒト単球系由来培養細胞株を用いる *in vitro* 試験法であり、3Rs の精神に合致している。また、1 試験あたりの費用は、マウスを用いる LLNA の 1/5 程度であり、試験期間も LLNA に比べて短期間であることから、本試験法は経済性および迅速性の面から有用といえる。しかしながら、本試験法は、細胞密度と培養時間を厳守することや公比 1.2 の濃度設定を必要とするため、別の皮膚感作発現イベントを指標とする Direct Peptide Reactivity Assay (OECD TG442C) や ARE-Nrf2 Luciferase Test Method (OECD TG442D) に比べて、操作が煩雑であり、制約が多い。また、陽性対照、陰性対照および媒体対照の測定を継続的に実施し、背景データを作成することが求められている。

EURL ECVAM によるバリデーション研究<sup>1)</sup>において、15 物質を用いて実施された施設内再現性は、73.3～86.7%であったが、試験時間の厳密な管理により再現性の向上が図れるとされている。一方、24 物質を用い 4 施設で実施された施設間再現性は 79.2%であった。一致しなかった物質は施設内再現性も悪かった。

EURL ECVAM<sup>1)</sup>、Takenouchi ら<sup>7)</sup>、および Nukada ら<sup>8)</sup>の結果を合わせた 142 物質（感作性物質：非感作性物質＝101：41、log Kow が 3.5 以上で陰性と判定された物質と混合物を除く）についての成績は、正確度 85%、感度 93%、特異度 66%であり、様々な化学物質に適用可能であることが示された。しかし、United Nations (UN) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) 分類における軽度～中等度感作性物質は偽陰性の判定が生じやすい傾向がある。また、試験溶媒に溶解しない物質および試験溶媒中で不安定な物質、揮発性物質、FITC や PI と同じ波長域に強い蛍光を有する物質、プロハプテンおよびプレハプテンのような活性化に代謝系を必要とする化学物質では正しく感作性が検出されない可能性があり、試験結果の解釈には注意が必要である。

### 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、フローサイトメトリーに習熟した施設であれば実施できる試験法であり、蛍光標識された特異抗体も市販されている。また THP-1 細胞の入手は容易であり、短期間で安価に実施できる。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、感作性物質と判定することは可能であるが、感作性強度分類や UN GSH のサブカテゴリー分類は困難である。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、Integrated Approaches to Testing and Assessment (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、適用範囲を十分に配慮した上で使用されるべきである。

## 参考文献

- 1) EURL ECVAM (2013). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report. Accessible at: [https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/news/news\\_docs/h-clat-validation-study-report](https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/news/news_docs/h-clat-validation-study-report).
- 2) EURL ECVAM (2015). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitization testing. Accessible at: [https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/news/news\\_docs/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing](https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/news/news_docs/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing)
- 3) OECD (2016). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E: *In Vitro* Skin Sensitization: human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Available at: [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-in-vitro-skin-sensitisation\\_9789264264359-en;jsessionid=3gdulzg8pwz1.x-oecd-live-02](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-in-vitro-skin-sensitisation_9789264264359-en;jsessionid=3gdulzg8pwz1.x-oecd-live-02)
- 4) JaCVAM皮膚感作性資料編纂委員会:皮膚感作性試験評価報告書 human Cell Line Activation Test (h-CLAT) (2016年7月25日).
- 5) EURL ECVAM (2015). Protocol No. 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT). <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/search/h-clat>
- 6) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of in vitro skin sensitization tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.*, 38, 275-284.
- 7) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic chemicals with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.*, 38, 599-609.
- 8) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro*, 26, 1150-60.

