

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.