

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™:	The ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSens™ 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™:	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さ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

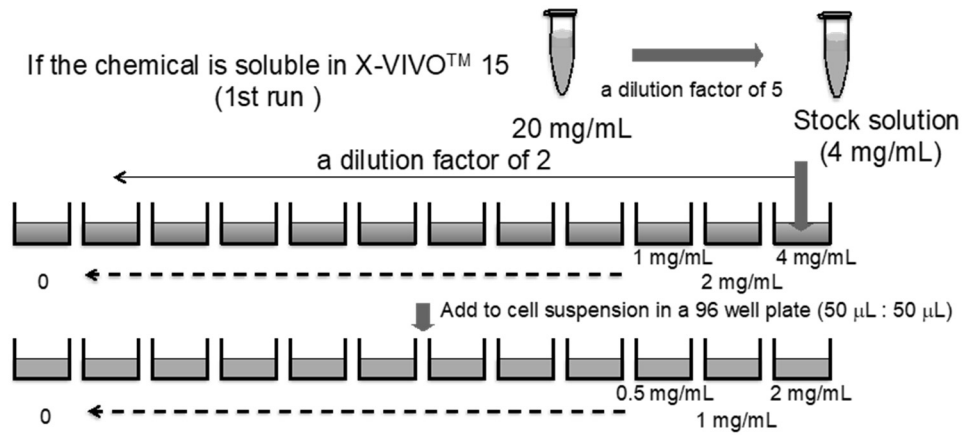
製する。各試験、各濃度とも 4 well ずつ設定する。

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 μ L 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。

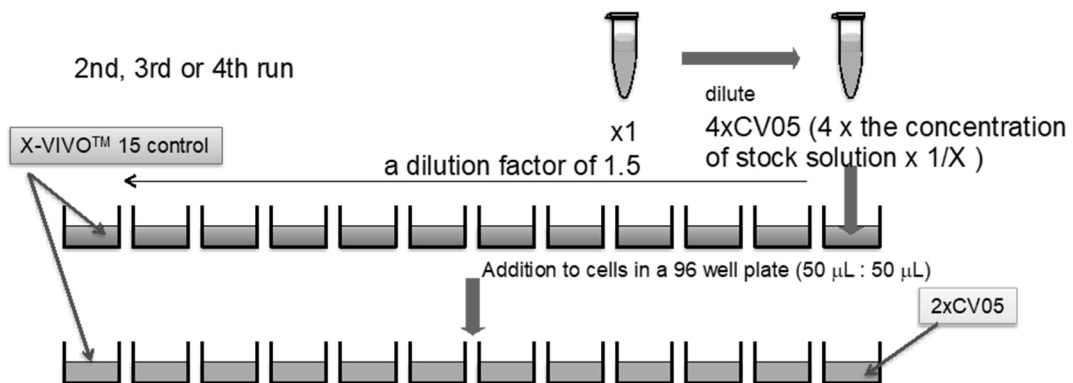
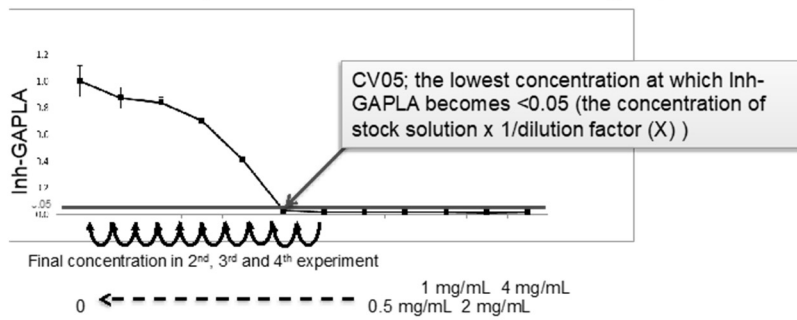
LA を推奨陰性対照物質とし、20 mg を 1.5 mL チューブ内で 1 mL の X-VIVO™ 15 に溶解させる(20 mg/mL)。さらに X-VIVO™ 15 を用いて 10 倍希釈(2 mg/mL) および 20 倍希釈(1 mg/mL)し、50 μ L の希釈液を同量の THP-G8 細胞とともに 96 穴平底黒色プレートに播種し(4 well/濃度)、攪拌した後 CO₂ インキュベーター内で 16 時間反応させ、ルシフェラーゼ活性を測定する。

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。

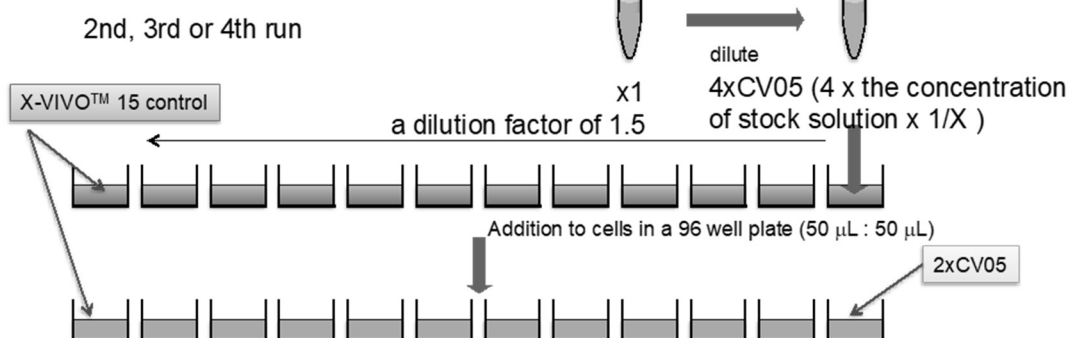
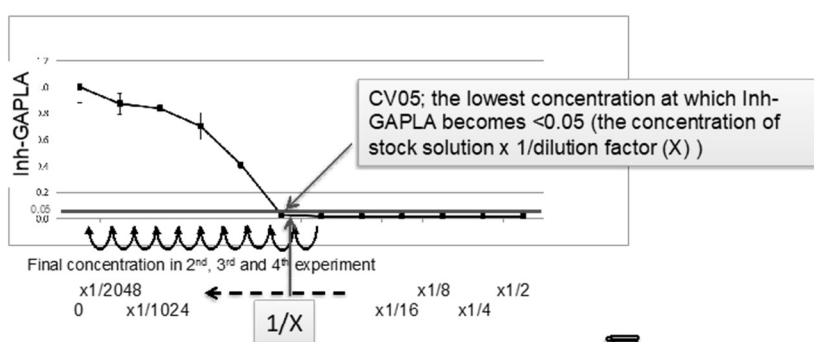
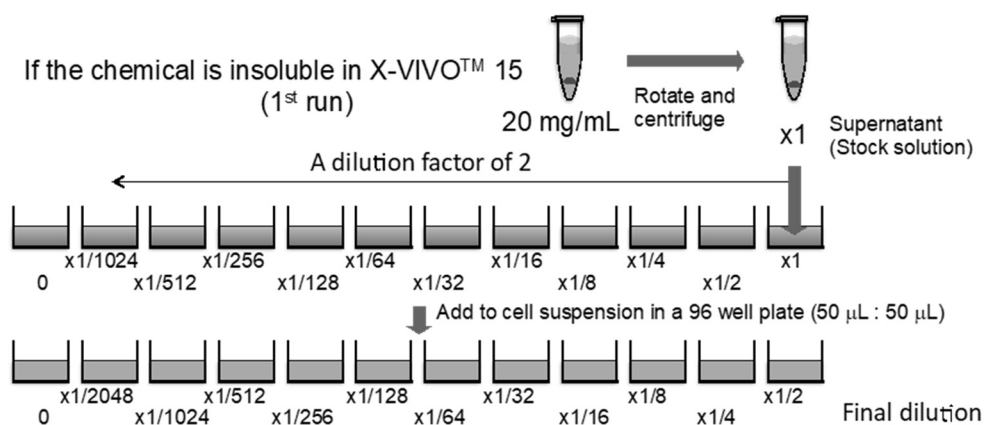
X-VIVO™ 15 に 20mg/mL で溶解する場合



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)

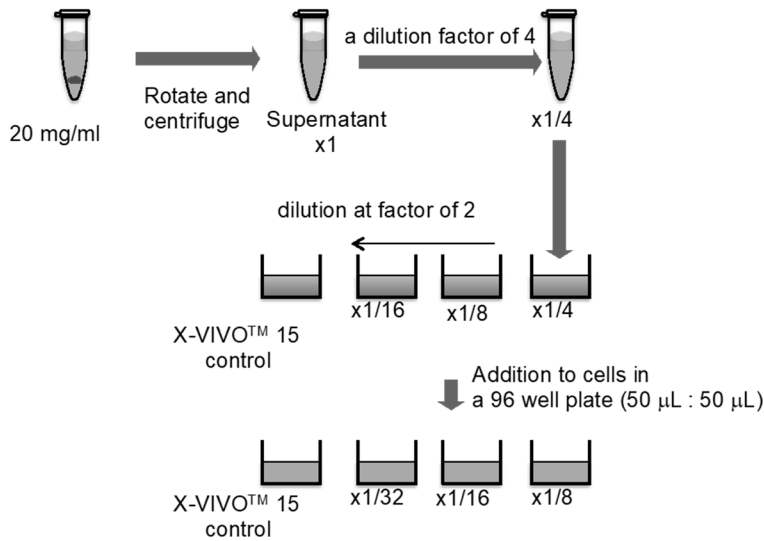


図 1 被験物質および対照物質の調製

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	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。

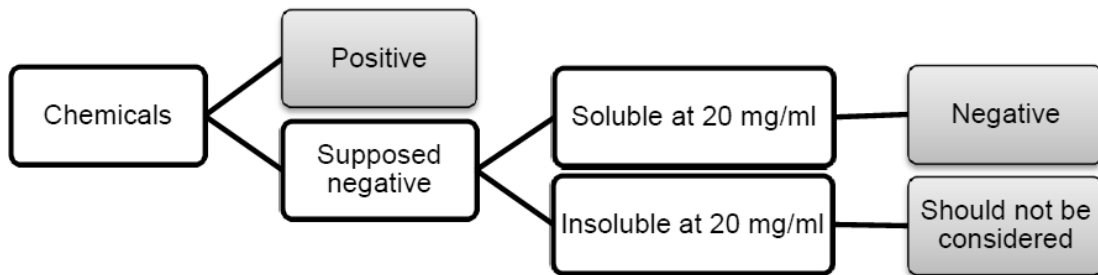


図2 感作性予測モデル

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、KeratinoSensTM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