

## 評価会議報告書

皮膚感作性試験：U937 Cell Line Activation Test (U-SENS™)

JaCVAM 評価会議

平成 30 年（2018 年）8 月 30 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)  
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)  
野口 真希 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構) \*  
森田 健 (日本環境変異原学会)  
横関 博雄 (日本皮膚免疫アレルギー学会)

任期 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 30 年 3 月 31 日

\* : 平成 29 年 4 月 1 日 ~ 平成 30 年 3 月 31 日

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)  
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)  
杉山真理子 (日本化粧品工業連合会)  
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/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)  
増村 健一 (日本環境変異原学会)  
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 ~ 平成 32 年 3 月 31 日

U937 Cell Line Activation Test (U-SENS<sup>TM</sup>) 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、ヒト組織球系リンパ腫細胞株である U937 細胞に被験物質を曝露したときの細胞表面分子 CD86 の発現変化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<sup>1)</sup>。

U-SENS<sup>TM</sup>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>2)</sup>、EURL ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) による評価 (ピアレビュー) が完了し<sup>3)</sup>、OECD 専門家会議における議論でより簡便な予測モデルに変更された後 2017 年 10 月に、OECD 試験法ガイドラインリストに追記された (TG442E Annex II)<sup>4)</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 U937 Cell Line Activation Test (U-SENS<sup>TM</sup>)」<sup>5)</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： U937 Cell Line Activation Test (U-SENS<sup>TM</sup>)

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組織球系リンパ腫細胞株である U937 細胞を用い、被験物質が U937 細胞を活性化する能力を評価する。U937 細胞に被験物質を添加して約 45 時間培養した後、Fluorescein isothiocyanate (FITC) で蛍光標識した CD86 に対する特異抗体、および Propidium iodide (PI) を用いて細胞を染色し、フローサイトメーターにより細胞表面分子 CD86 の陽性細胞率、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 の陽性細胞率を、媒体のみを添加したコントロールの陽性細胞率と比較し、Stimulation Index (S.I.) 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、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上昇を測定するという点で原理的に妥当である。本試験法は、EURL ECVAM によるバリデーション研究<sup>2)</sup>とそれに続く ESAC によるピアレビューにより、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>3)</sup>、より簡便な予測モデルに変更されて、2017 年 10 月に OECD 試験法ガイドラインに追記されている<sup>4)</sup>。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た。JaCVAM 評価会議では、ESAC ピアレビューと OECD 試験法ガイドラインを精査し、その評価が妥当であると判断した。

### 3. 本試験法の有用性と適用限界

本試験法は、ヒト組織球性リンパ腫患者から単離された細胞株を用いる *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。なお、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。

4 社で行われたバリデーション研究<sup>6)</sup>において、各社 15 物質を 3 回試験し、施設内再現性の平均は 90%であった。3 社は全ての試験で一致した結果(100%)を示したが、1 社は 9 物質のみ一致した(60%)。4 社による 38 物質に対する評価は 32 物質で一致し、施設間再現性は 84%であった。なお本法の開発者が当初提案した予測モデルは、OECD 専門家会議においてより簡便な予測モデルに変更され、上記の数字はその変更を反映したものである。

OECD 試験法ガイドラインでは、LLNA のデータがある 166 物質についての正確度(感度および特異度)の検討で、LLNA の結果に対して、正確度 86%、感度 91%、特異度 65%であり<sup>7)</sup>、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 Nation Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN GHS) 分類における軽度～中等度の感作性区分に入る物質は偽陰性の判定が生じやすい傾向がある。また、媒体に溶解または安定的に分散できる物質には適応できるが、界面活性剤等の細胞膜の構造変化を引き起こす物質、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感作性発現に酸化や細胞による代謝が必要な化学物質は正しく評価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、細胞培養と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 U937 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、感作性の強度を分類することは困難である。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、IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment) を構成するその他の情報と組み合わせて適切に評価することが必要である。なお、本試験法の利用にあたっては、適用範囲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) Piroird C, Ovigne JM, Rousset F, Martinozzi-Teissier S, Gomes C, Cotovio J, Alépée N (2015) The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29(5):901-16.
- 2) EURL ECVAM (2017) The U-SENS<sup>TM</sup> test method Validation Study Report. Accessible at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations)
- 3) EURL ECVAM (2016) ESAC Opinion No. 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS<sup>TM</sup> test method for skin sensitisation testing. EUR 28178 14 EN; doi 10.2787/815737. Available at: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705>
- 4) OECD TG442E (2017) IN VITRO SKIN SENSITISATION 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](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 U937 Cell Line Activation Test (U-SENS<sup>TM</sup>) (2018年6月6日)
- 6) Alépée N, Piroird C, Aujoulat M, Dreyfuss S, Hoffmann S, Hohenstein A, Meloni M, Nardelli L, Gerbeix C, Cotovio J (2015) Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30(1 Pt B):373-82.
- 7) EURL ECVAM (2016) Test Submission Template. U-SENS Test Submission Template. European Commission