

平成17年度光毒性試験代替法第一回評価委員会議事録
(酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験を用いた光毒性試験バッテリーの評価)

(日時) 平成18年2月24日(金) 午後2時-5時

(場所) 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 会議室

(参加者) 大野泰雄(国立衛研薬理部)、岡本裕子(コーセー研究本部・基礎研究所)、大森 崇(京都大学・医学部)、若栗 忍(食薬センター・秦野研究所)、小島 肇(国立衛研薬理部)

オブザーバー(提案者): 板垣 宏、森 眞輝、穂谷昌利、石川牧恵(以上、資生堂 安全性・分析センター)

バリデーション委員会代表: 吉村 功(東京理科大学・工学部)

欠席者: 田中憲穂(秦野研)、今井弘一(大阪歯科大学・歯科理工学)、畑尾正人(資生堂・基盤研究センター)、(配布資料)

1) 前回評価委員会議事録案(050124)

2) 酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験を用いた光毒性試験バッテリーの評価報告書(中間報告)

3) 光毒性試験代替法バリデーション研究における最適な毒性判定の基準値に関する検討(吉村)

4) 厚生労働科学研究の *in vitro* 光毒性試験バリデーションにおける酵母光生育阻害試験のプロトコール修正について(資生堂)

議事

1) 先回議事録および経緯確認

約1年ぶりの委員会開催となることから、先回の議事録(資料1)を通読した。一部、誤字脱字や内容が不可解な点の修正を加えながら、評価報告書(資料2)も参考に内容を確認した。この議事録は本日の修正点を盛り込み、小島が修正版を委員全員に再送した後、最終版とすることになった。

評価の基準となる、*in vivo* データの取り扱いについて、再確認がなされ、バリデーションでは資生堂の動物データを比較対照として用いたが、評価の場合には、ヒト陽性および動物陽性物質を基準にする場合と、動物の結果として資生堂データを基準にする場合、EU/COLIPA のデータを基準にする場合を明確に分けて判定すべきことが確認された。

2) グレーゾーンの必要性について

吉村バリデーション委員長より、東京理科大における最適な毒性判定基準に関する検討結果(資料3)が提示され、酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験の判定基準はそれぞれ4mmまたは5mm、2%または3%とする組み合わせが最適であると説明があった。この解析結果から、グレーゾーンの設定については疑問という問題提起があった。グレーゾーンに入ったら、再試験を行うという程度ならともかく、曖昧な数値を残しては代替法を用いた安全性評価できないとの意見を示された。この意見に賛同する声もあったが、グレーゾーンは意味があるとの意見も示された。その理由として、グレーゾーンに入った場合は他の試験結果を参考にすればよい、データのぶれの範囲としてグレーゾーンは必要であり、カットオフ値のみの設定は判断を誤る可能性がある、他の *in vivo* 試験法でもグレーゾーンは設定されているなどが挙げられた。

今回のバリデーション報告書ではグレーゾーンの有無で解析を行っており、試験法の検出力を考慮してこの問題はさらなる検討が必要とされた。

3) プロトコール修正について

この一年間資生堂において以下の評価委員会の指摘事項を解決すべく検討してきた。

- ① 試験結果はランプや暗幕の有無、検出器により影響を受けやすいことから、陽性対照物質への応答の幅を決め、試験の成立を判断すべき。
- ② 酵母法の 阻止帯の差が陽性対照で常に 10mm 位の値を示す検出力を高める条件を資生堂に確立してもらう必要がある。

検討結果について、資料4をもとに、石川氏より説明がなされた。結論として、以下の条件が提案された。

① 光照射量 20J/cm² (照射時間 199分: 以前のプロトコールでは光照射量は 8.5J/cm²、照射時間 83分)

② プレインキュベーション(事前暴露時間) 5時間

③ 陽性対照物質 8-MOP適用濃度 1mg/mL(以前の濃度は0.1mg/mL)

一方、岡本委員より、コーセーにおける検討内容(資料未配布)が報告され、8-MOPの濃度は1mg/mLでよいが、7時間を最長の暴露時間(50J/cm²相当)とした実験で、同一の光照射量において、照射時間の

みの暴露時間と 7 時間のトータル暴露時間による阻止円の差は 3 時間以下では大きかったが、3-7 時間で大きな差がなくなることから、光照射量を 25J/cm²とした場合、照射時間は 199 分（照射強度：2.1Mw/cm²）となり、暴露時間は試料の拡散時間として妥当との見解が示された。現状のプロトコールでは光照射量は少なく、その結果、照射時間も短かったことから、試料の寒天中での拡散が不十分であった。

資生堂の検討では、試験開始から終了までの作業時間が 10 時間にも及び、試料数を多くこなせない。コーサーの検討方法では、作業時間は 5 時間であるとされた。

ただ、検出力が高まったということは、equivocal が陽性となり、バッテリーの意味がなくなるのではないかという危惧も示唆された。

4) 今後の動向について

以上の報告、意見交換をもとに、現状の方法は陽性対照の検出力が低い、equivocal が多いという欠点を持っていたが、その改良に目処がたったとされ、全員の総意として追加バリデーションが必要であることが確認された。

酵母光生育阻害試験のみを追加で行うべく、資生堂においてプロトコールを再検討し、以前バリデーションに参加した施設に追加バリデーションの参加を打診するとともに、光照射器の確認、不参加施設には返却を要請するなどの連絡を若栗委員が行うことになった。

今後の予定として、以下の案が吉村バリデーション委員長および大野評価委員長から示された。

5 月初旬 新プロトコール提案

以降 評価委員会検討（承認後）→バリデーション委員会（承認後）→バリデーション実行委員会
バリデーション実行委員長：吉村 功

7 月-8 月 バリデーション実施

秋 バリデーション実行委員会

2007 年 1 月 評価委員会

5) その他

今後、腐食性評価を予定している。このワーキンググループの同一メンバーで評価を依頼したいと大野評価委員長より依頼があった。

半数から 2/3 のメンバー改選を望む声もあったが、承諾が得られた。本評価資料は 3 月上旬に送付の予定であると小島が説明した。

以上

資料 2 - 1 : LLNA-BrdU 法提案書 (化学物質評価研究機構武吉正博博士)

1 代替しようとする試験法の名称

マウス局所リンパ節増殖試験 (Murine local lymph node assay、LLNA)

2 代替しようとする in vivo 試験法に関する資料 (プロトコール, 再現性,

1) Local Lymph Node Assay (LLNA) の方法論

Local Lymph Node Assay (LLNA) は化学物質の感作性を推定するためのモルモットによる皮膚感作性試験の代替試験法として開発された試験法である。

動物

使用動物

未妊娠あるいは未経産の 8-12 週齢の CBA/Ca あるいは CBA/J マウスを用いる。使用動物の週齢は可能な限りそろえる。

検疫・馴化

検疫・馴化期間は最低 5 日間以上設ける。

群分け

馴化期間に異常が無かった動物を用いて無作為に対照群及び処置群に群分けする。

動物の識別

耳標などで個体識別を行う。

飼育管理および飼育環境

飼育室の温湿度は 21 - 3°C、30-70%、明暗サイクルは 12 時間ごと(明:12 時間、暗:12 時間)とする。給餌及び給水は自由摂取とする。

群構成

それぞれの試験群には陰性対照群(溶媒/媒体群)と陽性対照群を含むこととする。場合によっては無処置群を設けても良い。最低 1 群 5 匹で 3 用量の被験物質群を設ける。用量は 100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.5% などから選び、毒性や刺激性を避けた最大濃度を最大用量とする。陽性対照群は SI>3 とならなくてはならない。

調製

媒体

媒体は原則として耳介に塗布できる最大用量が調製できるものを用いることとする。推奨されている媒体はアセトン/オリーブ油混和液(4:1, v/v)、*N,N*-dimethylformamide (DMF)、methyl ethyl ketone (MEK)、propylene glycol (PG)、dimethylsulfoxide (DMSO)などがあるが、必要に応じてその他の媒体も使用することができる。

陽性対照物質

陽性対照物質には Stimulation Index (SI)が 3 以上を示すものを用いる。主な陽性対照物質としては hexyl cinnamic aldehyde (HCA) や mercaptobenzothiazole などがあるが、場合によっては他の陽性対照物質を用いても良い。

試験スケジュール

Day0 : 使用する各マウスの体重を測定する。耳介の背側に 25 μ L の被験物質、陽性対照物質あるいは媒体を塗布する。

Day1 及び Day2 : Day0 と同じ手順を行う。

Day3 及び Day4 : 操作は行わない。

Day5 : 各マウスの体重を測定する。³H-methyl thymidine (³H-TdR)を 20 μ Ci 含むリン酸緩衝液 (PBS) を 250 μ L あるいは ¹²⁵I-iododeoxyuridine (¹²⁵IU) を 2 μ Ci 及び 10-5M の Fluorodeoxyuridine を含む PBS を 250 μ L マウスの尾静脈から投与する。5 時間後に両耳介リンパ節を採取し、各個体ごとに PBS に入れておく。リンパ細胞は 200-mesh のステンレス金網あるいはその代替品を用いて物理的に Single cell にし、PBS 内で懸濁液 (Lymph Node Cells: LNC)にしておく。LNC は PBS で 2 度とも洗いし、4 $^{\circ}$ C で 18 時間、5% trichloroacetic acid (TCA)で DNA 反応を促進させる。

³H-TdR 法の場合には 1 mL の TCA にペレットを再懸濁させ、10 mL のシンチュレーション液に移す。トリチウム標識させて細胞内に取り込まれた thymidine は disintegrations per minute (dpm)として β -scintillation-counting によって各マウスごとに測定し、dpm / mouse を算出する。

¹²⁵IU 法の場合は、1 mL の TCA を直接ガンマ測定管に移し、取り込まれた ¹²⁵IU はガンマ線測定によって計測し、dpm / mouse を算出する。

結果の解析

各処置群の結果について SI の平均を求める。SI は各被験物質群あるいは陽性対照群の平均 dpm / mouse と媒体対照群の平均 dpm / mouse との割合である。求められた SI については対照群の SI と用量群の SI との間で適当な統計処理を用いて比較を行う (Dunnett s など)。一般的に SI が 3 を超えるものについて感作性を有すると判断される。

2) 再現性に関する情報

LLNA RI 法に関しては多くの論文が発表されており、再現性に関しても報告例がみられる。

①Basketter らはヒトに対して中等度の感作性を有する Isoeugenol を雌 CBA マウスを用い、0.5%、1.0%、5%の用量での LLNA 実験を 29 回繰り返し実施した際、データを報告している。

それによると 0.5%における SI 値の最小値は 0.7、最大値は 2.3、変動係数は 28%、1%における SI 値の最小値は 1.00、最大値は 6.3、変動係数は 53%、5%における SI 値の最小値は 4.9、最大値は 31.00、変動係数は 49%であった。

Test	SI ¹ at each concentration (%)			
	0.5	1.0	5.0	EC3% ²
1	1.0	1.1	12.4	1.2
2	1.5	2.5	29.8	0.6
3	0.8	1.6	14.1	1.1
4	1.3	2.2	13.1	1.0
5	0.8	2.8	5.6	2.1
6	1.8	2.9	23.2	0.6
7	1.6	1.6	14.7	1.0
8	1.6	1.4	14.7	1.0
9	1.7	1.2	5.0	2.6
10	1.2	4.2	18.4	0.7
11	2.3	1.6	23.6	0.6
12	1.6	2.2	7.5	1.6
13	1.4	1.5	4.9	2.6
14	1.3	3.3	14.7	1.5
15	1.5	3.0	19.2	0.8
16	1.0	1.0	12.8	1.2
17	1.6	2.2	19.0	0.8
18	1.2	1.4	19.3	1.8
19	1.6	4.3	24.4	0.6
20	1.0	1.3	7.5	1.8
21	1.4	1.2	6.7	2.0
22	1.5	2.6	19.2	0.8
23	0.7	2.3	13.8	1.0
24	1.1	1.8	23.2	0.8
25	0.9	6.3	31.0	0.5
26	1.2	3.2	8.7	1.3
27	0.9	1.0	7.2	1.9
28	1.1	1.9	15.3	1.0
29	2.0	1.4	7.6	1.6
Mean EC3 value				1.2

¹Stimulation index (SI) [mean disintegrations per minute (dpm)/node in the test group divided by mean dpm/node in the concurrent vehicle-treated control group].

²Estimated concentration required to cause a SI of 3.

	0.50%	1%	5%	EC3%
平均値	1.33	2.24	15.06	1.24
標準偏差	0.38	1.19	7.31	0.60
最小値	0.70	1.00	4.90	0.50
最大値	2.30	6.30	31.00	2.60
変動係数	28%	53%	49%	48%

Basketter DA, Cadby P. Reproducible prediction of contact allergenic potency using the local lymph node assay. *Contact Dermatitis*. 2004 Jan;50(1):15-7.

② Dearman らはヒトにおいて軽度の感作性を有する Hexylcinnamic aldehyde を用いて 8-16 週令の雌 CBA/Ca マウスに 0%, 2.5%, 5%, 10%, 25%, 50% の用量で投与する実験を 5 回繰り返し実施した際の結果を報告している。

それによると LLNA で陽性と判断される SI 値が 3 を超えた用量は 5 回の実験でそれぞれ、10%, 25%, 25%, 5%, 25% であり、SI 値が 3 を示すと推定される濃度 (EC3) の値はそれぞれ 6.85%, 9.63%, 8.74%, 4.1%, 9.15% であった。

Table 1. Temporal stability of local lymph node assay responses to HCA*

HCA conc. (% w/v)	Exp. 1 (Feb. 1997)		Exp. 2 (April 1997)		Exp. 3 (May 1997)		Exp. 4 (Oct. 1997)		Exp. 5 (Nov. 1997)		Mean	
	dpm node ⁻¹	SI	dpm node ⁻¹	SI	dpm node ⁻¹	SI	dpm node ⁻¹	SI	dpm node ⁻¹	SI	dpm node ⁻¹ ± SEM	SI ± SEM
0	472	-	475	-	325	-	159	-	188	-	324 ± 67	-
2.5	796	1.67	817	1.72	437	1.34	355	2.23	192	1.02	517 ± 122	1.60 ± 0.20
5	1002	2.12	998	2.10	685	2.11	608	3.19	256	1.36	680 ± 144	2.33 ± 0.22
10	2054	4.35	1127	2.37	879	2.70	1124	7.07	371	1.97	1111 ± 273	3.68 ± 0.93
25	3841	8.14	3396	7.15	2539	7.81	2207	13.88	1639	8.72	2724 ± 398	9.14 ± 1.21
50	6844	14.50	6896	14.10	4356	13.40	2795	17.58	2185	11.63	4576 ± 962	14.23 ± 0.97

* Groups of mice received 25 µl of various concentrations of HCA in AOC, or an equal volume of vehicle alone, on the dorsum of both ears daily for three consecutive days. Five days following the initiation of treatment, all mice were injected intravenously with 250 µl of PBS containing 20 µCi of ³H-TdR. Draining auricular lymph nodes were excised 5 h later, a single cell suspension was prepared and ³H-TdR incorporation was measured by β-scintillation counting. Incorporation of ³H-TdR (dpm node⁻¹) and stimulation index (SI) are displayed for each of five independent experiments. Mean values are also shown.

Dearman RJ, Hilton J, Evans P, Harvey P, Basketter DA, Kimber I. Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. *J Appl Toxicol*. 1998 Jul-Aug;18(4):281-4.

3) 特異性及び予測性に関する情報

Haneke らは ICCVAM による LLNA バリデーション報告書において以下のように報告している。

LLNA とモルモットを用いた皮膚感作性試験 (Guinea pig maximization test 及び Buehler test) の実験結果の比較 (N=97) においてモルモットの皮膚感作性試験において陽性と判定された物質が LLNA において陽性と判定される割合 (Sensitivity) は 91%、モルモットの皮膚感作性試験において陰性と判定される物質が LLNA において陰性と判定される割合 (Specificity) は 83% であり、LLNA のモルモットの皮膚感作性試験に対する精度 (Accuracy) は 89% と報告されている。同様にヒトにおける感作性物質及び非感作性物質のデータベースと LLNA の結果及びモルモットの皮膚感作性試験の結果をそれぞれ比較した場合、精度 (Accuracy) はともに 72% であり、両者の感作性物質の予測性能は変わらないと考えられている。

Performance Characteristics of the Local Lymph Node Assay (LLNA) against Guinea Pig and Human Sensitization Data—Total Database

Comparison	No. of comparisons	Sensitivity ^a	Specificity ^b	Positive predictivity ^c	Negative Predictivity ^d	Accuracy ^e
LLNA vs GPMT/BA	97	91% (62/68)	83% (24/29)	93% (62/67)	80% (24/30)	89% (86/97)
LLNA vs GPT	126	87% (81/93)	82% (27/33)	93% (81/87)	69% (27/39)	86% (108/126)
LLNA vs HUMAN	74	72% (49/68)	67% (4/6)	96% (49/51)	17% (4/23) ^f	72% (53/74)
GPMT/BA vs HUMAN	57	70% (38/54)	100% (3/3)	100% (38/38)	16% (3/19) ^f	72% (41/57)
GPT vs HUMAN	62	71% (42/59)	100% (3/3)	100% (42/42)	15% (3/20) ^f	73% (45/62)

Note. LLNA, local lymph node assay; GPMT, guinea pig maximization test; BA, Buehler assay; GPT includes nonstandard guinea pig tests; HUMAN, human maximization test (HMT) plus human patch test allergens (HPTA).

Number of comparisons refers to the number of substances tested in both systems; numbers in parentheses indicate actual number of comparisons for each analysis.

^a Sensitivity, the proportion of all positive chemicals that are correctly classified as positive in a test.

^b Specificity, the proportion of all negative chemicals that are correctly classified as negative in a test.

^c Positive predictivity, the proportion of correct positive responses among materials testing positive. The positive predictivity is a function of the sensitivity of the test and the prevalence of positives among the chemicals tested.

^d Negative predictivity, the proportion of correct negative responses among materials testing negative. The negative predictivity is a function of the sensitivity of the test method and the prevalence of negatives among the chemicals tested.

^e Accuracy, the proportion of correct outcomes of a method. Often used interchangeably with concordance.

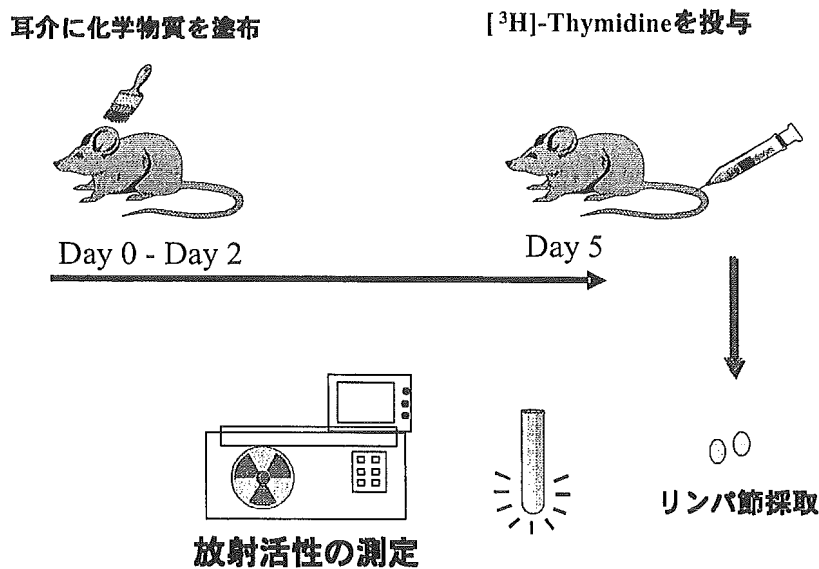
^f The poor but equal negative predictivity for the LLNA, GPMT/BA, and GPT test results versus human may be due to the nature of the human database used, which was biased toward substances used as HPTAs (approx. 57% when N = 74; 61% when N = 57; and 60% when N = 62).

Haneke KE, Tice RR, Carson BL, Margolin BH, Stokes WS. ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. Data analyses completed by the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods. Regul Toxicol Pharmacol. 2001 Dec;34(3):274-86.

3 代替法の原理に関する資料

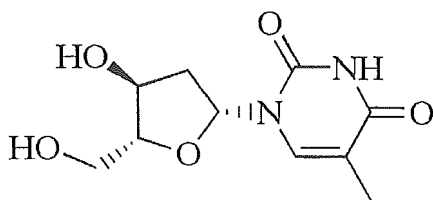
Local lymph node assay (LLNA) では初回抗原刺激によるリンパ球の増殖反応を指標にし、短期間に化学物質の感作性を推定できる新しい皮膚感作性試験法であるが、 ^3H -thymidine 等の放射性化合物 (RI) を使用しなければならず、特殊な実施施設を必要とし、放射能汚染、廃棄物処理の問題など実施上種々の制約を有する。

LLNA標準法 (RI法)

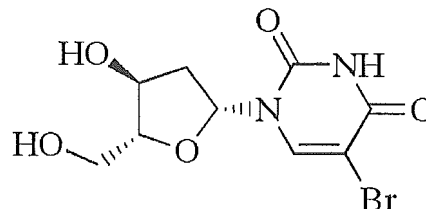


そこで ^3H -thymidine の代わりに Bromodeoxyuridine (BrdU)を用いることにより放射性化合物を使用しない LLNA の変法 (Non-RI LLNA 法) の開発を試みた。

BrdU は thymidine の類似物質であり、thymidine 同様、動物実験或いは in vitro 実験において細胞増殖に伴って DNA に取り込ませ標識することが可能である。



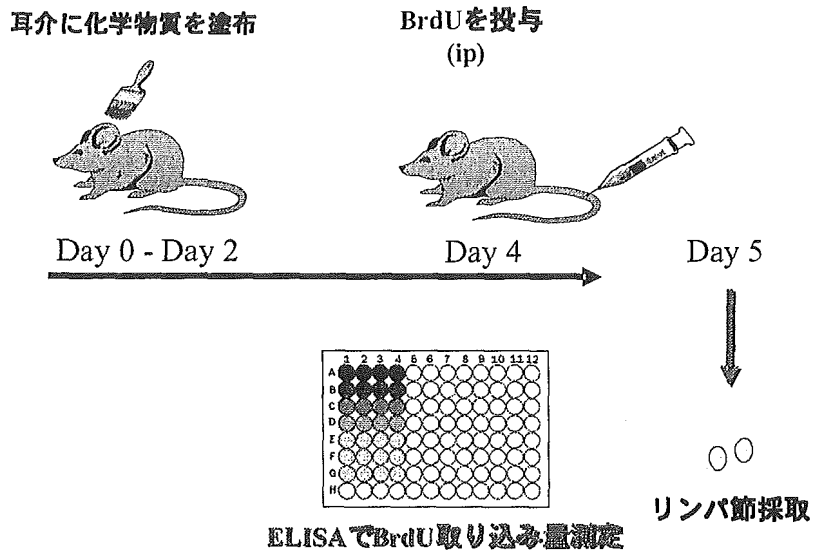
thymidine



5-bromo-2'-deoxyuridine

また、取り込まれた BrdU は酵素免疫測定法 (ELISA 法) よって定量することが可能である。LLNA-BrdU 法は LLNA RI 法における ^3H -thymidine 投与を BrdU

投与に代え、液体シンチレーションカウンタによる放射活性測定を ELISA 法による比色定量に置き換えたものであり、原理は標準法とされる LLNARI 法に極めて近いものである。



4 試験法の詳細なプロトコール

以下に標準的な実験プロトコールを示す。

4.1. 動物

4.1.1 使用動物

通常は未妊娠あるいは未経産の 8 週令から 12 週令雌 CBA/JN (日本チャールス・リバー株式会社)を用いる。

4.1.2 動物種選択の理由

CBA/JN は ICCVAM peer review report 及び OECD TG429 において推奨されている CBA/J の亜系統であるため。

4.1.3 検疫・馴化・群分け

動物は入荷後、5 日間以上期間検疫・馴化を行い、期間中順調に発育し健常と確認されたマウスを用いて、群分けを行う。

4.1.4 動物の識別

動物は油性インキによる尾へのマーキング等の適切な方法による識別を行う。

4.2. 飼育管理及び飼育環境

温湿度は $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、30-70%、明暗サイクルは 12 時間ごと(明:12 時間、暗:12 時間)とする。給餌及び給水は自由摂取とする。

4.3 群構成

基本的な群構成として、被験物質群に低用量、中用量及び高用量を設け、媒体対照群及び陽性対照群を設ける。

4.4. 調製

4.4.1 媒体

アセトンとオリーブ油を 4:1 (v/v)の割合で混和したもののアセトン-オリーブ油混液(AOO)が媒体としては最も適している。

その他に、優先順位としてジメチルホルムアミド(DMF)、メチルエチルケトン(MEK)、プロピレングリコール(PG)及びジメチルスルホキシド(DMSO)等の有機溶媒を用いることができるが、溶媒の選択は予備実験を実施してもとも高濃度で溶解或いは良好に懸濁可能なものを選択する。

4.4.2 被験物質及び陽性対照物質

調製濃度は溶解性を基準に適切な媒体を選択し、可能な限り高濃度での実験を行うことが望ましい。被験物質及び陽性対照物質の調製は上記媒体を用いて所定の濃度 (0.1%, 1%, 10%, 50%等) に調製する。

陽性対照物質としては 50% α -hexyl cinnamicaldehyde (HCA)、10%

Isoeugenol、1% 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)等を用いることが出来る。

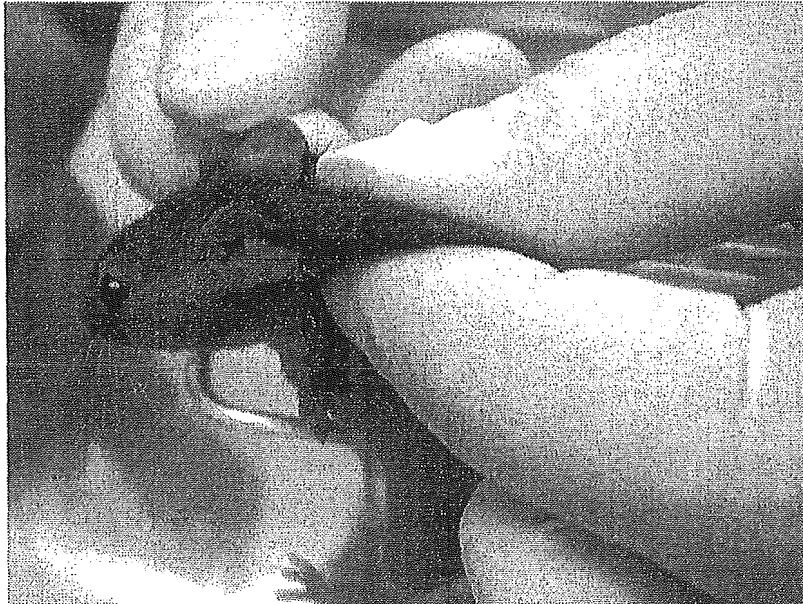
4.4.3 BrdU

BrdU (Nacalai tesque 製等) は注射用生理食塩液 (大塚製薬工場製等) を用いて 10mg/ml になるように調製し、完全に溶解した後、濾過滅菌を行う。使用当日に調製することが望ましいが、事前に調製する場合には、調製物を使用日まで-20℃以下で凍結保存し、投与日に解凍して使用する。

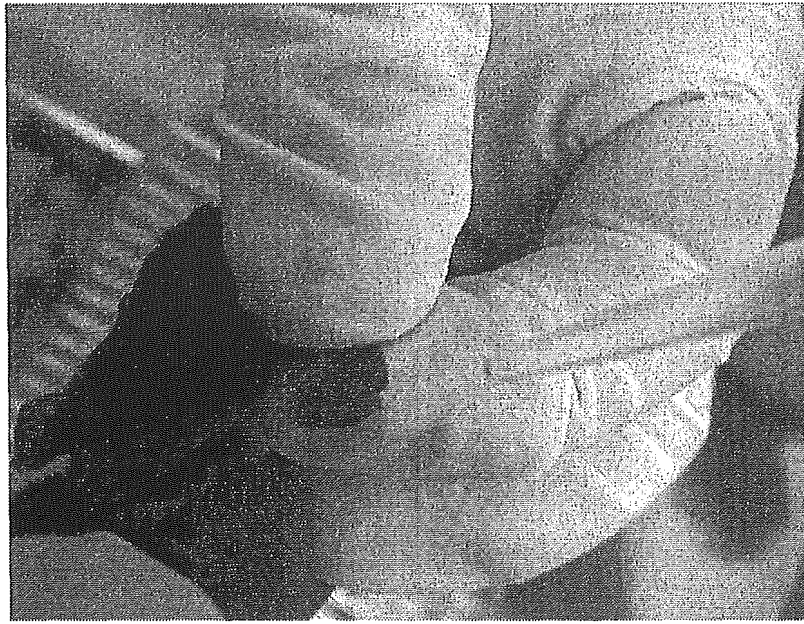
4.5. 感 作

4.5.1 感作手順

- 1) 保定者は、薬指と小指で尾をはさみ、親指と人差し指で頭部を保定し (気道は必ず確保する)、耳介を広げて保定する。



- 2) 実験者は、マイクロピペッターを用いて耳介にそれぞれ 25 μ L ずつ塗布する。



- 3) 塗布量は 25 μ L と少量であるが、流れ落ちないように注意し、数回に分けて塗布を行う。
尚、保定及び投与は一人で行うことも可能である。

4.5.2 投与回数及び時刻

毎日、ほぼ一定の時刻に 1 日 1 回、3 日間反復適用する。

4.6. BrdU の投与

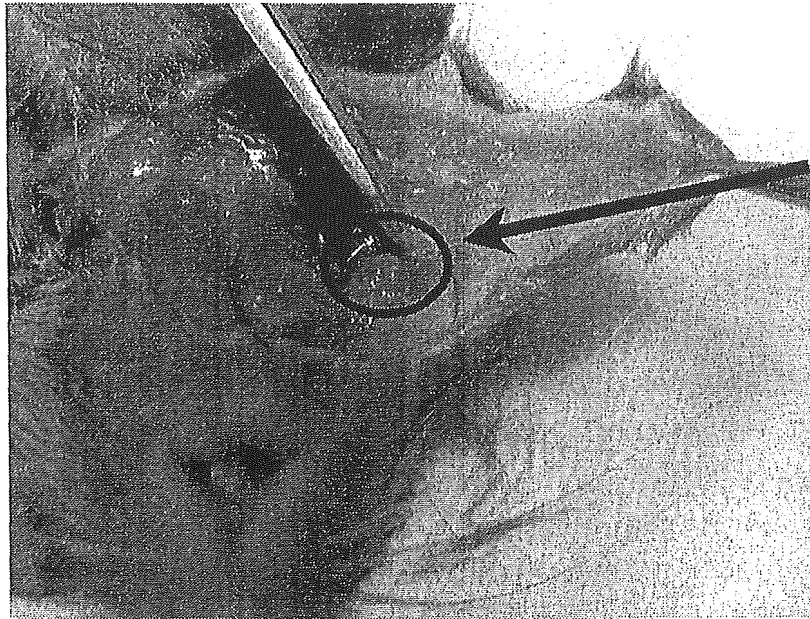
注射針と注射筒(テルモ株式会社等)を用いて 0.5 mL/匹を最終感作の約 48 時間後に 1 回腹腔内投与する。

4.7. 耳介リンパ節の採取

4.7.1 BrdU 投与の約 24 時間後にマウスを頸椎脱臼によって安楽死させた後、仰臥位にし下顎から頸部まで 70%エタノールで消毒する。

4.7.2 下顎から頸部まで正中線に沿って切皮後、皮下組織を剥離し、耳介下まで露出させる。

4.7.3 耳の直下に耳介リンパ節があるので注意深く探し、採取する。



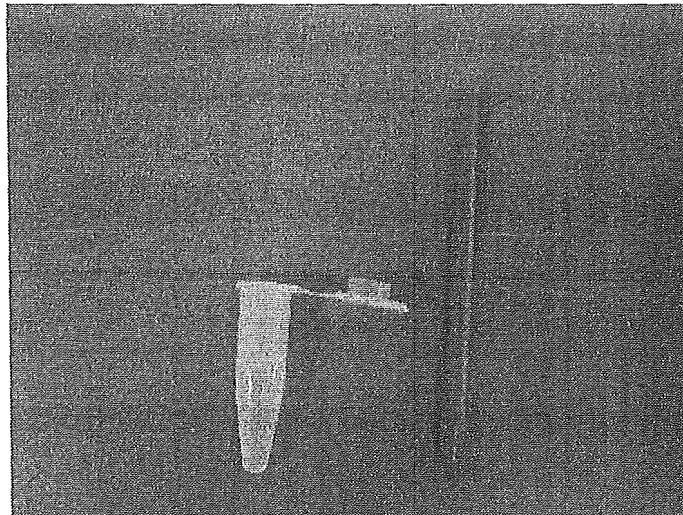
耳介リンパ節

- 4.7.4 耳介リンパ節には余分な脂肪組織がつかないように丁寧に取り除く。
- 4.7.5 採取した耳介リンパ節における BrdU 取り込み量を後日測定する場合は、重量測定後各個体毎の耳介リンパ節を識別した後、 -20°C 以下で凍結保存する。

4.8. BrdU 取り込み量の測定

4.8.1 材料及び使用機器

- ペレットペッスル付 1.5 mL チューブ (下図参照)
Pestles & Tubes (BEL-ART PRODUCTS Cat No. 19923-0000) 等



- ナイロンメッシュ (No.70)
- 20 mL プラスチック容器
- 50 mL 遠心管

- 96 well ELISA 用マイクロプレート
- 蒸留水
- 生理食塩液
- 測定キット (Boehringer Mannheim 社製 Cat No. 1647229 など)
- 遠心機(300×G 程度でマイクロプレートの遠心操作が可能なもの。)
- マイクロプレートリーダー (370-492nm 或いは 450nm-650nm の測定が可能なもの)

4.8.2 試薬の調製 (Roche Applied Science 社(旧 Boehringer)製 Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) Cat No. 11647229001 の場合)

1) Anti-BrdU-POD 液

Anti-BrdU -POD stock solution (Anti-BrdU-POD (バイアル)に 1.1 mL の蒸留水を加え、10 分間放置後、十分に混ぜる)を Antibody dilution solution で 100 倍希釈する。

2) Washing solution 液

Washing buffer concentrate を蒸留水で 10 倍希釈する。

4.8.3 前処理 (細胞浮遊液の調製)

- 1) カップに生理食塩液を 15 mL 用意する。
- 2) リンパ節の入った 1.5 mL チューブに 300-500 μ L 生理食塩液を入れペレットペッスルでつぶしながらリンパ球を分散させる。
- 3) 50 mL のチューブにナイロンメッシュを取り付け、懸濁液を濾した後、パスツールピペット等を用いて使い残りの生理食塩液で洗いこむ。

*上記の方法の他、2 枚のスライドガラスのスリ部分を利用して物理的に破碎・懸濁させることも出来る。但し細胞懸濁液の最終容量は 15 mL となるようにする。

4.8.4 測定準備及び測定

- 1) 細胞浮遊液を均一に分散させた後 96 well プレートに 100 μ L 分注する (N=3)。
- 2) 分注したプレートを 300_G、10 min 遠心する。
- 3) 上清を吸引除去する。
*この際、全量の 3/4 程度を吸引する。全量近くを吸引すると細胞も同時に吸引され、バラツキの原因となる。
- 4) 乾燥機で 20 min 乾燥させる (乾燥中はマイクロプレートのふたはかぶせない)。
- 5) マイクロプレート底面が完全に乾燥していることを確認した後、Fix Denat (測定キットに含まれる)を 200 μ L 添加し 30 min 静置する。
- 6) Fix Denat を捨て、ペーパータオルの上で水分を取る。

- 7) Anti-BrdU-POD 液を 100 μ L 添加し室温で 1 時間放置する。
- 8) Anti-BrdU-POD 液を捨てペーパータオルの上で水分を取る。
- 9) Washing solution 液を 200 μ L 添加し、プレートの中でピペッティング後(10 回/well)、液を捨てる操作を 3 回繰り返す。
- 10) Washing solution 液を捨てペーパータオルの上で水分を取る。
- 11) TMB 発色基質を 100 μ L 添加し暗所(机の引出し等)に入れ、15 min 放置する。
*反応時間は 5-30 分の間で適当な時間に設定可能であるが、十分に呈色反応が進行する時間に設定する。
- 12) 放置後、マイクロプレートリーダーで 370-492 nm で吸光度を測定する。*マイクロプレートリーダーのフィルターの関係等で 490-650 nm で測定を行う場合は反応停止液 (1M H_2SO_4) を 1 ウェル当たり 2 μ L 添加した後、測定を行う。

4.8.5 測定に用いなかった試料の保管

- 1) 細胞懸濁液はそのまま冷所にて 24 時間は保存、再測定が可能である。

4.9 結果の評価

各個体の BrdU 測定値の平均値を算出した後、陰性対照群の平均値を算出する。各個体の BrdU 測定値の平均値を陰性対照群の平均値で除した数値 (Stimulation Index, SI) を算出した後、各用量群の平均値、標準偏差及び標準誤差を算出する。

対照群の平均 SI 値+3SD を cutoff 値としてそれを超える場合或いは対照群と処置群の SI 値間で統計解析 (Dunnett test, Unpaired t-test 等) を実施し有意差が認められる場合で、且つ SI 値の平均値が 1.5 を超える場合を陽性と判定する。

参考文献

Takeyoshi, M., Yamasaki, K., Yakabe, Y., Takatsuki, M. and Kimber, I., 2001. Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. Toxicology Letters 119, 203-208

5 検討した被験物質のリストと化学物質としての特性に関する資料
実験に使用した化学物質のリストを以下に示す。

ID	Chemical Name	Cas No.	Manufacturer	Lot No.	Purity	RI 法での結果 ^a	感作性強度 ^b
1	2,4-dinitrochlorobenzene	97-007	和光純薬工業株式会社	TCR1735	99.4%(GC)	+	Extremely weak
2	<i>p</i> -Benzoquinone	106-51-4	関東化学株式会社	012D2294	98%	+	Extremely weak
3	diphencyclopropenone	886-38-4	和光純薬工業株式会社	TCK7554	-	+	Strong
4	Glutaraldehyde	111-30-8	和光純薬工業株式会社	PKM7225	-	+	Strong
5	<i>p</i> -phenylenediamine	106-50-3	SIGMA	59F0003	-	+	Strong
6	2-mercaptobenzothiazole	149-30-4	ALDRICH	10315HU	98%	+	Moderate
7	Cinnamic aldehyde	104-55-2	関東化学株式会社	7687A	-	+	Moderate
8	isoeugenol	97-54-1	ALDRICH	06214HO	98	+	Moderate
9	<i>m</i> -Aminophenol	591-27-5	関東化学株式会社	009D2193	>97%	+	Moderate
10	3-(4-Isopropylphenyl) isobutyraldehyde	103-95-7	東京化成工業株式会社	GL01	90+%T	+	Weak
11	Citral	5392-40-5	ナカライテスク株式会社	M7K6160	97%	+	Weak
12	eugenol	97-53-0	カネボウ株式会社	EG0704	95w/v%以上	+	Weak
13	Hydroxycitronellal	107-75-5	和光純薬工業株式会社	KSK5525	>95%	+	Weak
14	_hexylcinnamaldehyde,tech	101-86-0	ALDRICH	01026AQ	85%	+	Weak
15	Isopropyl myristate	110-27-0	東京化成工業株式会社	GH01	-	+	Extremely weak
16	2-Hydroxypropylmethacrylate	923-26-2	和光純薬工業株式会社	SEM4085	95%	-	Not sensitizing
17	Aniline	62-53-3	関東化学株式会社	009G1751	>99%	-	Not sensitizing
18	Glycerol	56-81-5	ナカライテスク株式会社	V6M2408	99%	-	Not sensitizing
19	Isopropanol	67-63-0	ナカライテスク株式会社	V0K7035	99.5%	-	Not sensitizing
20	<i>p</i> -Chloroaniline	106-47-8	関東化学株式会社	102D2015	-	-	Not sensitizing
21	Phthalic acid diethyl ester	84-66-2	東京化成工業株式会社	AY01	99%	-	Not sensitizing
22	propyleneglycol	57-55-6	和光純薬工業株式会社	ELL5449	99.0%(GC)	-	Not sensitizing
23	Dimethyl isophthalate	1459-93-4	関東化学株式会社	810S4123	-	-	Not sensitizing

a: Haneke KE, Tice RR, Carson BL, Margolin BH, Stokes WS. ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. Data analyses completed by the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods. Regul Toxicol Pharmacol. 2001 Dec;34(3):274-86.

b: Gerberick GF, Ryan CA, Kern PS, Dearman RJ, Kimber I, Patlewicz GY, Basketter DA. A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. Contact Dermatitis. 2004 May;50(5):274-88., Basketter DA, Balikie L, Dearman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, White IR, Rycroft RJ. Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. Contact Dermatitis. 2000 Jun;42(6):344-8.

第4回 LLNA-DA 評価委員会および第一回 LLNA-BrdU 評価委員会合同委員会議事録

(日時) 平成17年7月26日(火曜日) 午後1時—午後3時半

(場所) 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会議室

(参加者) 五十嵐良明(国立衛研環境衛生化学部)、大野泰雄(国立衛研薬理部)、金澤由基子(秦野研)、高木弘毅(アベンティス)、筒井尚久(三菱ウェルファーマ)、手島玲子(国立衛研機能生化学部)、萩野滋延(資生堂)、牧 栄二(安評センター)

申請者: 出原賢治、山下邦彦(ダイセル化学)、武吉正博(化学物質評価研究機構)

オブザーバー: 笛木 修(医薬品医療機器総合機構新薬審査第一部)

(配布資料)

- 1) LLNA-BrdU 法についての説明資料(事前配布資料)
- 2) 評価委員会名簿
- 3) 第3回評価委員会議事録案
- 4) ダイセル化学工業より提案があった皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA 法)の一次評価報告書(厚生労働科学研究報告)
- 5) 2) についての産業医科大学医学部皮膚科島内隆寿のコメント
- 6) 今後のスケジュールについて
- 7) 化学物質評価機構より提案された皮膚感作性試験代替法の評価委員会での評価について
- 8) LLNA-BrdU 法の説明(武吉配布)

1) はじめに

大野委員長より会議参加のお礼が述べられた。次いで、配布資料の確認がなされた。名簿の確認と修正が行われた。また、本日の議事内容について、確認された。

2) LLNA-DA 法の評価について

2-1) 資料4について、確認と修正が行われた。主な修正点は以下のとおり。

- ① 表紙に金澤由基子先生の名前を追加する。
- ② 牧先生の所属をヤンセン協和からヤンセンファーマに修正する。
- ③ p7 第二パラグラフ4行目のDENBをDNCBに修正する。
- ④ p8 C-3-4)施設内再現性の項の第一パラグラフを削除する。

その他にも修正箇所があれば、今週の金曜日までに大野委員長に連絡するとされた。

2-2) 資料5に示されたコメントが代替法に関する厚生労働科学研究班の会議で提出されたコメントであることが大野委員長より説明され、それについて、審議を行った。審議結果は以下のとおり。

- ① 3日目と5日目のリンパ節を摘出し、2群について解析すべきとのコメントに対しては、LLNA-DA 法では3日目での測定値はまだ低いレベルにあり、分けて測定しても皮膚感作性物質の評価の上で得られるところは無い。
- ② Th1 あるいは Th2 のどちらにシフトしているかの解析については、学問的には更に調べる価値はあるかも知れないが、従来の LLNA 法と比較して数的には増加しているもののこれらの細胞比率については変化がなく、また、皮膚感作性の評価に Th1/Th2 バランスの確認を

求めていないため、LLNA-DA 法を LLNA の代替法として評価する上では不要と思われるとされた。

以上より、コメントによる報告書修正の必要は無いとされた。

2-3) 本報告書は修正後、日本動物実験代替法学会会長に提出する。また、同学会バリデーション委員会に報告し、バリデーションの実施を求めるとされた。

2-4) 資料6に基づき、今後のスケジュール案について審議され、以下の目標が立てられた。

- 1) 代替法学会への評価報告書とバリデーション依頼書送付：今週中
- 2) バリデーション委員会への説明：8月中
- 3) バリデーション委員会での LLNA WG 設置：8月中
- 4) バリデーション計画、プロトコル作成、被験物質選択：8月中
- 5) バリデーション参加企業募集：9月中
- 6) バリデーション説明会：10月中
- 7) バリデーション実施（被験物質配布）：11-1月
- 8) バリデーション結果集計、まとめ：2-3月
- 9) 報告書作成：2-3月

これに基づき、提案者にバリデーション計画、プロトコル作成、被験物質候補の作成が依頼された。また、委員にも被験物質候補の提案が求められた。

3) LLNA-BrdU 法について

提案者である武吉博士よりスライドおよび配布資料8を用い説明が行われ、質問を受けた。その要旨は以下のとおり。

- ① BrdU の投与時期について、RI 法では5日目に ^3H -methyl thimidine 静脈内投与されるが、non-RI(BrdU)法では4日目に BrdU が腹腔内投与される。なお、BrdU 法では3日と4日、4日のみ、或いは4日と5日に投与されても同様の結果であり、複数回投与しても特に感度が高くない。
- ② SI 値は RI 法より若干小さくなる。その理由は RI 測定と抗 BrdU 抗体による ELISA 測定のダイナミックレンジの違いにあると考えている。また、Thimidine に比べて BrdU は分子量が大きいことも要因になっている可能性もある。
- ③ 陰性と陽性の間の判定基準について、いくつかのパラメータについて検討された。対照群と処置群との差を統計的に計算し、有意差が出たものについて、陽性とするのは良いが、グリセロールが陽性となる問題がある。
- ④ 提案者は対照物質との比較試験による感作性強度の分類も行っているが、今回は LLNA 法の代替法としての評価を受けたいことから、今回の提案方法となった。また、

相対比較法では使用動物数が多くなる。

- ⑤ EC3 ではマウスの系統により差が認められ、反応性は CBA/JN に比べて CBA/N の方が高い。CBA/JN マウスで BrdU 法を実施した場合に EC1.5 の濃度が、CBA/Ca マウスを用いた RI 法での EC3 がほぼ近い値となる。
- ⑥ Aniline と p-chloroaniline は RI 法では陰性となるが、BrdU 法では陽性となる。これらはモルモットでの GPMT では陽性となる。
- ⑦ 施設内再現性は HCA で調べられており、3-5 回の繰り返し実験での再現性は良い。
- ⑧ 施設外再現性についてはいくつかの物質を用いて、石原産業、日本新薬、富士フィルム、北興化学で検討され、提案者とほぼ同様の結果が得られた。
- ⑨ 刺激性のものについては、北興化学でフェノールを調べた。陽性との結果が得られた。処置 3 日までに浮腫となるものは刺激性と判定して良いかも知れないが、詳しい検討は行っていない。
- ⑩ 特許は CBA/N 系マウスの使用と試験物質の感作性強度の相対比較法について申請してあるが、今回の提案プロトコールについては特許申請は行われていない。

判定基準や試験プロトコールについて、以下のような指摘があった。

- ① この方法について、皮膚感作性の強さとは必ずしも対応しない。実験時のバラツキによって判定結果が影響を受けてしまい、バラツキの小さいデータでは低い値でも陽性となり、バラツキが大きい場合には値が高くても陰性になるという問題がある。LLNA の原法では SI 値を判定基準にしているため、BrdU 法においても、例えば SI 値について適切なカットオフ値を設定し、統計学的な解析結果と合わせて陽性・陰性の判定をするのが良いのではないかと考える。
- ② この判定に基づく判定結果の一致については、 κ 係数も算出して議論する事を薦める。
- ③ 判定する際のカットオフ値を検討する際には、ROC 曲線を使用して参考にすると良いかも知れない。
- ④ LLNA 原法では、統計解析を行うには動物数 4 ではなく 5 とするとされている。
- ⑤ 提案されたプロトコールでは週休 2 日制をとる機関では必ず休日出勤が必要となるため、試験がやりづらいところもある。これを改善するように、BrdU の投与時期とリンパ節採取時期を提案プロトコールよりも 1 日ずつ遅らせたプロトコールがあるが、そうした条件での試験経験及び結果はあるか？
- ⑥ リンパ節の重量及びリンパ節細胞数について SI 値は測定しているか。それらの SI 値を ELISA 吸光度のそれと比較したことはあるか。
- ⑦ 例えば、同じ物質を処理した場合でも、その試験群内の 4 匹の動物間における吸光度差、施設間において吸光度の値が大きく異なっている。感作性の有無を評価する上

で、SI 値が 1.5 を 1 つの基準としているが、こうしたばらつきを考えると SI 値だけでの判定や評価は難しいと思う。これは、ELISA 法自体の手技者の違いや洗浄染色段階でのばらつきが大きいことが原因ではないかとの印象がある。今回は提案はされていないが、相対比較法であれば、ばらつきの問題は解決されないが、評価は可能になるかもしれない。

⑧ BrdU 測定キットとして、提案法以外の別の試薬メーカーのものを使用したことはあるのか？

なお、台風が接近していることもあり、予定時間を早めて解散した。委員からのコメントは配布資料を若干修正したものを後で e-mail で送り、それに記入して大野委員長に送り返してもらい、それを整理し、再度意見を求めるとされた。また、可能であれば LLNA-DA 法と同時期にバリデーションを行うため、なるべく早く評価するとされた。

以上

文責：大野泰雄