

(財) 化学物質評価研究機構より提案のあった  
皮膚感作性試験代替法(LLNA-BrdU法)の一次評価報告書(v5)

日本動物実験代替法学会 評価委員会

委員長\*

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所)

副委員長

金澤由基子 ((財) 食品薬品安全センター 秦野研究所)

委員

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部)

高木弘毅 (アベンティス ファーマ (株) 研究開発部門 医薬開発本部 統計解析・データ  
マネジメント部 統計解析室)

田中憲穂 ((財) 食品薬品安全センター 秦野研究所)

筒井尚久 (三菱ウェルファーマ (株) 創薬本部 安全性研究所)

手島玲子 (国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部)

萩野滋延 ((株) 資生堂 安全性・分析センター 代替法開発プロジェクト室)

牧 栄二 ((財) 食品農医薬品安全性評価センター)

オブザーバー

笛木 修 ((独) 医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部)

(所属は平成17年8月31日現在)

(財)化学物質評価研究機構より提案のあった

皮膚感作性試験代替法(LLNA-BrdU法)の一次評価報告書

要旨

平成16年度の厚生科学研究班の決定により、(財)化学物質評価研究機構から提案のあった皮膚感作性試験 Local Lymph Node Assay (LLNA)の放射性同位元素(RI)標識化合物を用いない代替法(LLNA-BrdU法)を評価した。この方法は先に評価したダイセルから提案されたATP含量の変化を指標とする方法(LLNA-DA法)と極めて類似していることから、評価委員会ではLLNA-DA法を評価するために組織した感作性試験評価ワーキンググループ(WG)で評価することとした。WGは申請者データに基づいて一次評価を行い、本試験法は原法であるLLNA法における<sup>3</sup>H-Methyl thymidineのDNAへの取り込みの代わりにBromodeoxyuridine (BrdU)取り込みを細胞増殖の指標にしたものであり、ほとんど同じ原理による方法であること、指標の増加率は若干原法より小さいが、ほとんど同一の識別能力を持つこと、RIを用いないこと、簡便であるといった利点があると判断した。しかし、行政試験法として評価する為には、更にデータの信頼性や施設間ばらつきについての情報を得る必要があることから、評価委員会からの指摘に対応し、プロトコールなどを修正した後に、多施設バリデーションを実施するよう日本動物実験代替法学会バリデーション委員会に依頼することとした。

## A. 目的および背景

医薬品などの皮膚感作性は主にモルモットを用いた Maximization test 法やその変法などで評価されてきたが、定量性に乏しいことや、免疫反応誘発の段階で動物にストレスを与えるという、動物愛護の面での問題もあり、新しい方法が求められてきた。最近、定量性のある試験法として Kimber ら(1986)や Basketter ら(1996)によりマウスを用いる Local Lymph Node Assay (LLNA)が提案され、欧米を中心にバリデーションが行われ、広く使用されるようになった。OECD の安全性試験法ガイドラインとしても 2002 年に承認された(OECD Guideline 429 Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, adopted 24th April 2002)。しかし、この方法は  $^3\text{H}$  で標識されたチミジンの DNA への取り込みを指標とする方法であるため、放射性同位元素(RI)の取扱い規制の厳しい日本での普及は不十分であった。RI を用いない方法として Bromodeoxyuridine (BrdU)の取り込みを検出する方法(Takeyoshi ら 2003)や IL-2 産生を検出する方法 (Hatao ら 1995, Hariya ら 1999) が報告されていたが、未だ十分にバリデートされていなかった。一方、ダイセル化学工業(株)の山下と出原らは ATP 含量を測定する方法を独自に開発し、代替法に関する厚生労働科学研究班(主任研究者 大野泰雄)に評価を依頼した。研究班ではこの方法が RI を用いないという利点以外にも簡便で、かつ時間のかからない方法であり、評価するに値する方法であると考え、日本動物実験代替法学会(代替法学会)に評価を依頼した。これを受け、代替法学会では評価委員会において、平成16年度より検討を行い、本試験法については適切な方法ではあるが、多施設によるバリデーションが実施されていないことから、施設間バリデーションを行うように勧告した。その結果を待って、再度評価する予定である。一方、上記の LLNA-BrdU 法も開発者の武吉により、上記厚生労働科学研究班に評価依頼が申請された。研究班では LLNA-DA 法の評価を既に行っていることもあり、慎重に検討したところ、感作誘導法が LLNA 原法と同一であり LLNA-DA 法より原法に近い試験法と考えられること、また、実際に試験を行う立場としては試験法に複数の選択肢ができるのが望ましいとの結論に達し、評価を代替法学会に依頼した。代替法学会では評価委員会で LLNA-BrdU 法も皮膚感作性試験代替法としてその妥当性について評価することとした。

## B. 評価方法

### B-1) 評価組織

評価委員会では LLNA-DA 法の評価の際に組織されたワーキンググループで引き続き LLNA-BrdU 法についても評価することとした。このワーキンググループに感作性試験の専門家、代替法評価の経験のある専門家、および統計の専門家によりワーキンググループが含まれている。また、同様にオブザーバーとして、医薬品医療機器総合機構の医薬品審査担当者の参加を求めた。以下に委員の名簿を示す。

### 評価委員会

#### 委員長

大野泰雄(国立医薬品食品衛生研究所)

#### 副委員長

金澤由基子((財)食品薬品安全センター秦野研究所・毒性部)

#### 委員

五十嵐良明(国立医薬品食品衛生研究所・環境衛生化学部)

高木弘毅(アベンティス ファーマ株式会社 研究開発部門 医薬開発本部 統計解析・データマネジメント部 統計解析室)

筒井尚久(三菱ウェルファーマ 創薬本部 安全性研究所)

手島玲子(国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部)

萩野滋延((株)資生堂、安全性・分析センター 代替法開発プロジェクト室)

牧 栄二((財)食品農医薬品安全性評価センター)

#### オブザーバー

笛木 修((独)医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部)

### B-2) 提案者

提案者は(財)化学物質評価研究機構日田事業所、試験研究第二課 武吉正博博士である。

### B-3) 秘密の保持と評価結果の公表について

審議結果は公開シンポジウムや研究報告書などで公開することを前提にしているが、個人の経歴に関する情報は公開せず、また、委員にも配布せず、事務局で保管し、必要に応じて口頭あるいは書面提示の上で説明すべきとされた。また、今回の申請資料に掲載されたデータに基づいて今回の目的を越えて、利用、解析、公表する際には個別に申請者に了解を得なければならないとされた。なお、既に論文などに発表されたデータの利用は自由とされた。

#### B-4) 評価に使用した資料および会議資料

主に、(財)化学物質評価研究機構より提供を受けた資料、論文、生データおよび集計データに基づいて評価した。申請時に提供された資料は以下のとおりである。

代替試験法申請書類、皮膚感作性試験：LLNA-BrdU法、(財)化学物質評価研究機構

資料1) 代替しようとする試験法の名称

資料2) 代替しようとする *in vivo* 試験法に関する資料

資料3) 代替法の原理に関する資料

資料4) 試験法の詳細なプロトコール

資料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

資料6) 検討した被験物質の LLNA-RI 法および LLNA-BrdU 法試験結果に関する資料

資料7) 試験法の感度、特異性、予測性、精度(一致率)を記載した資料

資料8) 試験法の特徴

資料9) 試験法のバリデーションと、その QC に関する資料

資料10) その他、データ解析上有用な資料(生データなど)

資料11) 論文(または、学会発表資料&印刷中の論文原稿)

なお、以下の資料は以前 LLNA-DA 法を評価した際に、事務局より委員に配布したものである。

資料12) OECD guideline for the testing of chemicals 429, Skin sensitization: Local lymph node assay (adopted 24<sup>th</sup> April, 2002)

資料13) ICCVAM immunotoxicology working group-based on an independent expert peer review panel evaluation of the LLNA. Protocol: Murine Local Lymph Node Assay (LLNA): Assessment of allergic contact dermatitis potential (January 2001)

また、今回の評価に際し、以下の評価表が配布された。

資料14) 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(評価項目案)

会議の記録は以下のとおりである。

第1回 LLNA-BrdU 評価会議(2005.7.26)議事録

#### B-5) 評価の方法

評価委員会では、事前に資料を委員に配布した上で、会議を開催し、提案者より提出された申請内容を評価した。その際 LLNA-DA 法を評価した時に事務局が作成した評価項目案に基づいて行うことを事前に確認した。第一回の評価委員会では提案者から試験法についての説明を受け、委員より出された疑問点について申請者が回答したが、十分に審議する時間が無かったことから、その後、各委員より評価結果を委員長に送付し、委員長はそれをまとめ、委員に戻し、再度、e-mail を介して意見をもとめ、一次評価文書をまとめた。

なお、出された疑問点については適宜提案者に問い合わせ、その回答を踏まえ一次評価を行った。

なお、今回の申請では LLNA-DA 法の場合とは異なり、多施設によるバリデーション結果が提出されていたが、OECD 基準で示されたコード化された被験物質を用いて行ったものでは無かったことから、最終評価は行えなかったものである。一次評価の結果多施設で再度バリデーションする価値があるとされた場合には代替法学会にそれを依頼する。その際、評価委員会の審議によりプロトコールなどが若干修飾される可能性があるが、その際は提案者の意向を尊重することとした。

#### C. 評価結果

##### C-1) 代替しようとする試験法

皮膚感作性試験においてはモルモットを用いた試験法が主に使用されてきた。OECD ガイドラインに掲載された方法としては、guinea-pig maximization test (GPMT)および Buehler assay (BA)がある。これらの試験法は、感作誘発期の皮膚反応を肉眼的に観察・評価することにより、モルモットに対する化学物質の感作性の有無を検出するものである。しかし、評価が主観的であること、試験に5週間を要すること、コストおよび感作誘発による動物へのストレスの問題がある。

Local lymph node assay (LLNA)法は Kimber ら(1986)により提案された皮膚感作性試験であり、マウス耳介に3日間連続して被験物質を塗布し、6日目に <sup>3</sup>H-Methyl thymidine または <sup>125</sup>I-Iododeoxyuridine を静脈内投与し、5時間後に摘出したリンパ節より調製したリンパ球懸濁液の放射能を測定することにより、局所リンパ節中の細胞増殖反応を評価する試験法であり、媒体対照群の3倍以上の結果が得られたときに陽性と判定される。この方法は基本的に感作誘導期における反応を調べる方法で、従来の GPMT 方法と比べ、以下の

ようなメリットがある。

- 1) 試験期間が1週間と短い。
- 2) 結果が数値として得られるため、客観的かつ定量的。
- 3) リンパ球の増殖は被験物質の量および感作性能に相関して起こるため、用量依存性がある。
- 4) Freund's complete adjuvant (FCA)を用いないなど動物に与えるストレスを軽減できる。
- 5) 使用動物数削減が可能。
- 6) コスト削減が可能。
- 7) 着色物質の評価が可能。
- 8) モルモットと比較してマウスの免疫系に関する情報が多くある。
- 9) 感作誘導期の評価であるため、将来的にメカニズムの研究や試験法の進歩が期待できる。

これらのメリットから、欧米では LLNA 法による感作性試験・研究が広く行われ、データが蓄積され、ICCVAM での評価を経て、OECD ガイドラインとして受け入れられた。EPA, FDA, OSHA も受け入れている。

しかし、リンパ節の細胞増殖反応の検出に放射性同位元素(RI)標識化合物の DNA への取り込みを指標として用いていることや、RI をマウスに尾静脈投与するという手技上の問題があり、わが国での普及が妨げられている。RI を用いない改良法として BrdU の取り込みや IL-2 産生を検出する方法が報告されているが、十分にバリデートされていなかった。

## C-2) 申請法について

### C-2-1) LLNA-BrdU 法の原理

皮膚感作性は経皮的に取り込まれた低分子化学物質（ハプテン）が生体のタンパクと結合して感作原となることにより起こると考えられている。感作誘導期ではタンパクと結合したハプテンがランゲルハンス細胞に取り込まれ、活性化されたランゲルハンス細胞が所属リンパ節に遊走し、T-リンパ球に抗原提示を行う。抗原提示を受けた T-リンパ球は特異抗原を認識した T-リンパ球として増殖する。

LLNA 法はマウス耳介から吸収された被験物質（ハプテン）による抗原特異的 T-リンパ球の増殖を、耳介リンパ節（標的臓器）における RI 標識化合物(<sup>3</sup>H-Methyl thymidine)の核酸成分への取り込みを指標として検出する方法である。一方、申請された LLNA-BrdU 法は細胞増殖を検出する指標を BrdU の DNA への取り込み量に変更したものであり、基本的な原理は LLNA 法と変わらないと考えられる。

なお、LLNA-BrdU 法は感作誘導については LLNA 原法と同一であるが、BrdU を腹腔内投与し、リンパ球増殖の指標としての BrdU の取り込み量を ELISA で測定するところが LLNA 原法と異なっている。結果の解析手法として LLNA 法は <sup>3</sup>H-Methyl thymidine の取り込みが3倍以上となることを、陽性と判断するエンドポイントとしているが、提案された LLNA-BrdU 法ではいくつかの指標について、記載されており、それらの妥当性が評価委員会で特に審議した点である。

### C-2-2) LLNA-BrdU 法のプロトコール

LLNA-BrdU 法のプロトコールを以下に要約する。

使用動物：未妊娠、未経産の 8-12 週令の雌性 CBA/JN マウス(日本チャールス・リバー株式会社)を用いる。

なお、CBA/JN マウスは、感作性物質として知られている *p*-Benzoquinone に対する応答性が免疫学実験に汎用されている BALB/cAnN および Closed colony の CD-1 と比較し、応答性が高いことが、提案者により確認されている。

投与群設定：陰性対照群(媒体対照群)と陽性対照群を設ける。最低 1 群 5 匹で 3 用量の被験物質群を設ける。

用量は 0.1%, 1%, 10%, 50%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。なお、陽性対照群としては、 $\alpha$ -Hexylcinnamic aldehyde (HCA)や Isoeugenol、2,4-Dinitrochlorobenzene(DNCB)などを用いる。

群あたり動物数：1 群あたり 5 匹以上

溶媒：一般的に使われるものはアセトン・オリーブ油混液 (v/v = 4:1、AOO) であるが、他に N,N-Dimethylformamide (DMF)、Methyl ethyl ketone (MEK)、Propylene glycol (PG)、Dimethylsulfoxide (DMSO)なども使用することができる。

試験操作：

#### 1) 感 作

毎日ほぼ一定の時刻に、マウスの両耳介にマイクロピペッターなどを用いて 1 耳介あたり 25  $\mu$ L を塗布する。感作は初日を Day 0 として Day 2 までの 3 日間連続塗布する。

#### 2) BrdU の投与

最終感作の 2 日後 (Day 4) に BrdU 生理食塩液溶液 (10mg/ml) を 1 匹当たり 0.5 ml 腹腔内投与する。

### 3) リンパ節の採取

BrdU 投与の 24 時間後 (Day 5) に動物を安楽死させた後、頸部を切開し耳の直下にある耳介リンパ節を採取する。採取したリンパ節は直ぐに測定しない場合は -20℃ 以下で保存可能であり、採材日以降に解凍して測定に供することも出来る。

### 4) BrdU 取り込み量の測定

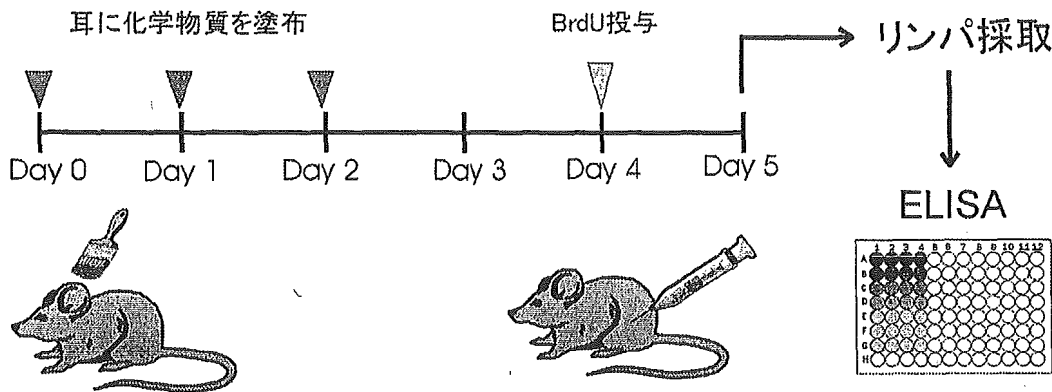
耳介リンパ節を 1 匹分毎にマイクロチューブ内で少量の生理食塩液と共にすりつぶし、ナイロンメッシュ (No.70) で濾過した後、最終的に 15 mL の生理食塩液に分散する。この細胞分散液の 0.1 mL をマイクロプレートに移し BrdU 取り込み量の測定に供する。測定には市販の BrdU 測定キット (Roche Applied Science 社製の Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric kit, Cat. No.11647229001) を用いる。

結果の判定：

対照群 (媒体のみ投与) の BrdU 取り込み量に対して化学物質を投与した群の取り込み量の比、Stimulation index (SI) を求め、各用量群の平均値、標準偏差および標準誤差を算出する。対照群の平均値 +3SD を cutoff 値としてそれを超える場合を陽性と判定する。また、対照群と処置群の間で統計的手法 (Dunnett test, Unpaired t-test など) を用いて有意差が認められる場合を陽性としてもよい。

実施方法の概略を図 1 に示す。

図 1 Non-RI LLNA の概略



### C-2-3) LLNA-BrdU 法の特徴

LLNA 法と比較し、LLNA-BrdU 法の特徴は以下のように要約される。

- 1) LLNA 法はリンパ細胞増殖の指標として  $^3\text{H}$ -Methyl thymidine の DNA への取り込みを測定するが LLNA-BrdU 法では RI を使用しない方法として、BrdU の取り込み量の増加を指標としたものであり、原理的に LLNA 法に極めて近い。
- 2) 被験物質の投与方法、スケジュールは LLNA 原法と同一である。すなわち、3 日間連続投与により感作誘導を行い、6 日目のリンパ球増殖を測定する。
- 3) 再現性については、データを単純に比較することができないため明確に述べることはできないが、提案者の施設で行われた 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)、Isoeugenol、 $\alpha$ -Hexylcinnamic aldehyde (HCA) の 3 物質を用いた 3 回の繰り返し実験の結果を見ると、報告されている LLNA 法のデータと比較して劣ることはないようであり、概ね同等もしくは良いと推察された。
- 4) 感作性物質の識別性はどの cutoff 値をとるかによって異なる。提案者は当初、判定基準を「対照群の平均値 +3SD を cutoff 値としてそれを超える場合を陽性と判定する。また、対照群と処置群の間で統計的手法を用いて有意差が認められる場合を陽性としてもよい。」としていたが、評価委員会の提示した「統計学的有意差が認められ、しかも SI 値がある一定基準値を超える場合を陽性とするような組み合わせによる判定基準にすべき」との意見に基づいて検討し、「統計処理により陰性対照と有意差を有し、且つ SI 値が 1.5 以上を示すものを陽性とする場合および陰性対照の平均 +3SD を基準としてそれを超え、且つ SI 値が 1.5 以上を示すものを陽性とする」場合に False positive を最小、且つ一致率の最も高い結果が得られるという知見を得た。この時の一致率はカッパー係数で 0.8 を上回り、LLNA-BrdU 法は LLNA 法とほぼ一致する結果を示した。
- 5) RI 標識化合物を静脈内投与しないことから実験操作や廃棄物処理が容易である。

### C-2-4) 提案書に記載されたバリデーシンの種類

提案者の施設で実施された試験で LLNA-BrdU 法のバリデーションが行われ、再現性や識別性を検討し、

LLNA 法と比較した。また、提案施設以外にも石原産業、日本新薬（株）および富士写真フィルム（株）において検討されたが、多施設バリデーションとしては被験物質が少ないこと、また、コード化した被験物質が配布されていないことから、OECD(1996)が示した適切な多施設バリデーションの基準を満たしているとは言えないと考えられた。提案法について、公平な評価を行う上では更に多施設バリデーションの結果が必要である。

### C-3) 提案者の行ったバリデーションの結果について

#### C-3-1) 被験物質の妥当性

被験物質は 23 種類で、その内 LLNA 原法で陽性と判定されているものが 15 種類、陰性と判定されているものが 8 種類であった。

被験物質には、クロロベンゼン類 (DNCB: 2,4-Dinitrochlorobenzene, p-Chloroaniline)、芳香族アミン類 (pPDA: 4-Phenylenediamine, Aniline, p-Chloroaniline)、フェノール類 (Isoeugenol, Eugenol, m-Aminophenol)、キノン類 (p-Benzoquinone)、ケトン類 (Diphenylcyclopropenone)、アルデヒド類 (Glutaraldehyde, Cinnamic aldehyde, HCA:  $\alpha$ -Hexylcinnamic aldehyde, Citral, 3-(4-Isopropylphenyl)isobutyraldehyde, Hydroxycitronellal)、アルコール類 (Isopropanol, Glycerol, Propylene glycol)、チオール類 (MBT: 2-Mercaptobenzothiazol)、エステル類 (Isopropyl myristate, Phthalic acid diethyl ester, Dimethylisophthalate, 2-Hydroxypropylmethacrylate)、酸化・還元剤 (p-Benzoquinone, Diphenylcyclopropenone) など、様々な種類の化学物質が含まれていた。しかしながら、LLNA 法で偽陰性となりやすいと思われる金属塩類 ( $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiSO}_4$ ) は含まれていなかった。また、殺菌剤 (Propylparaben など)、界面活性剤 (Benzalkonium chloride など)、カルボン酸 (Trimellitic anhydride, Abietic acid など)、Urea 類 (Imidazolidinyl urea など) も含まれていなかった。

感作性の程度に関しては、強い感作性物質である DNCB, p-Benzoquinone, pPDA, Diphenylcyclopropenone, Glutaraldehyde、比較的強い感作性物質として MBT, Cinnamic aldehyde, Isoeugenol, m-Aminophenol、弱い感作性物質として Eugenol, HCA, Citral, 3-(4-Isopropylphenyl)isobutyraldehyde, Isoeugenol, Hydroxycitronellal、極めて弱い感作性物質として Isopropyl myristate、また、非感作性物質として 2-Hydroxypropylmethacrylate, Aniline, Glycerol, Isopropanol, p-Chloroaniline, Phthalic acid diethyl ester, Propylene glycol, Dimethylisophthalate が選択されている。

以上から、施設内バリデーションでの被験物質の数と選択はほぼ適切であると考えられるが、今後行われるバリデーションでは LLNA 法で金属塩や水溶性物質のように偽陰性となりやすい物質もいれておく必要がある。

#### C-3-2) *In vivo* データとの対応性

下の表に示したように、多くの物質について LLNA-BrdU 法は LLNA 法と同じ結果が得られた。LLNA-BrdU 法と LLNA 法との間の判定の一致率は識別値を 95%信頼区間 (CI) とした時は 83%、3 標準偏差 (SD) とした時は 91%、SI 値 3 以上とした時は 87%、SI 値 2 以上とした時は 87%であった。

なお、MBT の結果が SI3 あるいは SI2 を識別値とした時、陰性であったが、Basketter ら(1992)や DeJong ら(2002)による LLNA の報告では陽性であり、OECD ガイドライン 429 では、MBT を陽性対照物質として推奨している。なお、LLNA-DA 法では 10%で SI 値が 2.0 と有意な増加は見られるものの、3 を超えず陰性とされた。それ以上の濃度では逆に SI 値が低下している。LLNA 法の場合と異なり、LLNA-BrdU 法で SI 値が低くなる理由は今のところ不明であるが、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や BrdU は元々 DNA 合成の内因性基質ではないことからその取り込み速度が Thymidine に比べて遅いのではないかと議論がなされた。また、LLNA 法と同様に LLNA-DA 法も金属塩類の検出感度は良くないが、LLNA-BrdU 法では検討されていなかった。

表：23 検体の判定結果のまとめおよび他の試験結果との比較

| 物質名                      | 感作性<br>強度 | LLNA | LLNA<br>-BrdU<br>95% CI | LLNA<br>-BrdU<br>3SD | LLNA<br>-BrdU<br>SI 3 | LLNA<br>-BrdU<br>SI 2 | LLNA<br>-DA |
|--------------------------|-----------|------|-------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------|
| 2,4-Dinitrochlorobenzene | +++       | +    | +                       | +                    | +                     | +                     | +           |
| p-Benzoquinone           | +++       | +    | +                       | +                    | +                     | +                     | +           |
| Diphenylcyclopropenone   | +++       | +    | +                       | +                    | +                     | +                     |             |
| Glutaraldehyde           | +++       | +    | +                       | +                    | +                     | +                     |             |
| 4-Phenylenediamine       | +++       | +    | +                       | +                    | +                     | +                     | +           |
| 2-Mercaptobenzothiazole  | ++        | +    | +                       | +                    | —                     | —                     | —           |
| Cinnamic aldehyde        | ++        | +    | +                       | +                    | +                     | +                     | +           |
| Isoeugenol               | ++        | +    | +                       | +                    | —                     | +                     | +           |
| m-Aminophenol            | ++        | +    | +                       | +                    | +                     | +                     |             |

|                                       |     |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------------------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|
| 3-(4-Isopropylphenyl)isobutyraldehyde | +   | + | + | + | + | + | + |   |
| Citral                                | +   | + | + | + | + | + | + | + |
| Eugenol                               | +   | + | + | + | + | + | + | + |
| Hydroxycitronellal                    | +   | + | + | — | — | — | — |   |
| $\alpha$ -Hexylcinnamic aldehyde      | +   | + | + | + | + | + | + | + |
| Isopropylmyristate                    | +/- | + | + | + | + | + | + |   |
| 2-Hydroxypropylmethacrylate           | —   | — | — | — | — | — | — |   |
| Aniline                               | —   | — | + | — | — | — | — |   |
| Glycerol                              | —   | — | + | — | — | — | — |   |
| Isopropanol                           | —   | — | — | — | — | — | — |   |
| p-Chloroaniline                       | —   | — | + | + | — | — | + |   |
| Phthalic acid diethyl ester           | —   | — | — | — | — | — | — |   |
| Propylene glycol                      | —   | — | — | — | — | — | — |   |
| Dimethyl isophthalate                 | —   | — | + | — | — | — | — | — |

LLNA: Local lymph node assay, LLNA-BrdU: LLNA modified by Takeyoshi, LLNA-DA: LLNA modified by Daisel Kagaku.

95% CI : 95% confident interval, 3SD: SD\*3, SI3: Stimulation Index 3, SI2: Stimulation index 2,

### C-3-3) データの信頼性

提案者はアレルギー試験について平成元年より経験がある。また、LLNA-BrdU 法は提案者が独自に開発したものである。その成果は 6 報の原著論文および総説にまとめられており、十分な技術蓄積があるものと思われる。方法自体も尾静脈でなく腹腔内投与を採用し、さらに ELISA 法での BrdU 取り込み量の測定は市販のキットを用いるなど技術面で困難と思われる所は認められない。また、提案者の属する安全性試験施設は GLP 認定施設であり、GLP 試験に準じた試験操作に習熟しており、特に問題は無いと思われた。従って、技術面でデータの信頼性はある程度高いと考えられる。後で述べるように、プロトコールに関しては若干の修正があったが、データの信頼性に関わるものでは無かった。全体として具体的かつ丁寧に記述されており、施設内バリデーションの結果も適切にまとめられていた。個別データも提出され、施設内バリデーション結果を確認できた。

提案者以外の施設における試験の信頼性についての情報は無かったが、個別データは提出されており、確認できた。しかし、OECD のバリデーション基準からみると不十分であり、多施設バリデーションはコード化された被験物質を用いて実施し、データの信頼性を更に確認する必要がある。

なお、Back ground data の高い事例が幾分見られたが、酵素基質を入れてからの時間など、測定操作の詳細を定め、明示する必要があると思われる。

### C-3-4) 施設内再現性

LLNA 法の再現性に関し、Basketter ら(2004)はヒトに対して中等度の感作性を有する Isoeugenol を 0.5, 1.0, 5%の用量で LLNA 実験を 29 回繰り返した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 31.0、変動係数は 49%であった。また、Dearman らはヒトにおいて軽度の感作性を有する  $\alpha$ -Hexylcinnamic aldehyde(HCA)を 2.5,5,10,25,50%の用量で 5 回繰り返したデータを報告している。それによると 2.5%における SI 値の最小値は 1.02、最大値は 2.23、変動係数は 28%、5%における SI 値の最小値は 1.36、最大値は 3.19、変動係数は 30%、10%における SI 値の最小値は 1.97、最大値は 7.07、変動係数は 57%、25%における SI 値の最小値は 7.15%、最大値は 13.88%、変動係数は 30%、50%における SI 値の最小値は 11.63%、最大値は 17.58%、変動係数は 15%であった。

LLNA-BrdU 法の再現性については、提案者は陽性対照物質である 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)、Isoeugenol、 $\alpha$ -Hexylcinnamic aldehyde (HCA)の 3 物質の繰り返し実験を行った。DNCB では 3 回繰り返し実験の結果、いずれも SI 値は 3 を上回り、陰性対照群の SI 値+3SD を基準とした判定で全て陽性と判定された。なお、3 回繰り返し実験の平均 SI 値は 15.2 であり、その変動係数は 16.8%であった。Isoeugenol では 3 回繰り返し実験の結果、いずれも SI 値は 3 を上回り、陰性対照群の SI 値+3SD を基準とした判定で全て陽性と判定された。なお、3 回繰り返し実験の平均 SI 値は 8.02 であり、その変動係数は 28.0%であった。HCA では媒体として Acetone/olive oil (AOO) または Methyl ethyl ketone (MEK)の 2 種類の媒体を用いてそれぞれ 5 回繰り返し実験を行った。その結果、いずれの媒体を用いた場合も SI 値は 3 を上回り、陰性対照群の SI 値 +3SD を基準とした判定で全て陽性と判定された。なお、5 回繰り返し実験の平均 SI 値は AOO で 6.10、MEK 6.21



であり、変動係数は AOO の場合 36.6%、MEK の場合で 33.9%であった。

再現性については、両者のデータを単純に比較することができないため明確に述べることはできないが、提案者の施設で行われた 3 物質を用いた 3 回の繰り返し実験の結果を見ると、報告されている LLNA 法のデータと比較して劣ることはないようであり、概ね同等もしくは良いと推察された。

ただし、当初の提案から判定基準を修正する方向であるため、新たに設定し直した基準に基づく結果の再現性も確認する必要がある。

#### C-3-5) 施設間再現性

提案施設以外に、石原産業において 6 陽性物質、日本新薬（株）において 3 陽性物質、富士写真フィルム（株）において 3 陽性物質が検討され、SD の 3 倍を超える場合に陽性と判定する方法では、いずれも陽性との結果が得られた。これらの被験物質には強い感作性から弱いものまで含まれており、それらがいずれも陽性と判定されたことは、判定において施設間の再現性は良いと思われた。しかし、非感作性物質については検討されていない。今後行われる多施設バリデーションにおいては、非感作性物質についての再現性も検討する必要がある。また、当初の提案から判定基準を修正する方向であるため、新たに設定し直した基準に基づく結果の再現性を確認する必要がある。

留意すべき結果としては、石原産業での媒体対照群の吸光度値が他施設に比べてコンスタントに高値を示している。酵素基質を入れてからの時間や ELISA 操作における洗いや染色操作に個人差などの問題が考えられるが、原因を明らかにし、媒体対照群の吸光度値を適正なものにする必要があると思われる。

#### C-3-6) 比較対照とした *in vivo* データの妥当性

申請書の 5 項で示された被験物質の *in vivo* データは、別記したものを除き、Gerberick ら (2004) および Basketter ら (2000) の論文に記載された LLNA データから引用したものである。一方、7 項では *in vivo* データとの対応性を LLNA 法の論文に記載された結果との比較で考察しているが、LLNA-BrdU 法は LLNA 法の代替法であるので、既存の LLNA 法データと比較することは妥当であると考えられる。しかし、LLNA 法の最終目的はヒトの感作性を予測することであるので、Haneke ら (2001) の論文に示されたヒトでの感作性の有無や Basketter ら (2002) の論文などに示されたヒトでの感作性強度との対応性についても、比較検討することが望ましいと思われる。

GPMT との対応性についても、Eugenol とその 2 量体の場合を除き、検討されていない。得られたデータに対して多面的な考察をしていくために必要となるので、あらかじめ可能な限りデータを収集し、被験物質を選択する時にも留意することが望ましいと思われる。

#### C-3-7) 試験法の頑健性

OECD TG429 を始め、これまでに承認されたガイドラインおよび ICCVAM による LLNA 法バリデーション報告書においてマウスの系統選択に関しては CBA/Ca マウス或いは CBA/J マウスが推奨系統として記載されている。我が国では CBA/J 系のマウスとして入手可能なものは CBA/JNCrj（日本チャールスリバー）のみである。そこで国内で入手可能なマウスとして CBA/JN、BALB/c、CD-1（いずれも日本チャールスリバー）を用いて、ヒトに対してアレルギー性を有する p-Benzoquinone に対する応答性を比較した。その結果、いずれの系統も用量依存的に SI 値の上昇が認められたが、最低濃度の 0.25% で SI 値が 3 を超えた系統は CBA/JN であり、CD-1 は最高濃度の 1% でも SI 値は 3 に達しなかった。これらの 3 系統の応答性に関して用量および系統を Factor として Two-way ANOVA による解析を実施した結果、CBA/JN が最も応答性が良いことが確認された。また、p-Benzoquinone を用いた検討で、CD-1 と他の 2 近交系系統の間には交互作用が認められた。

このように、マウスは系統によって感作性物質に対する反応が異なることから、適切な系統のマウスを用いるとともに、常に陰性および陽性対照を用い、その反応性を確認することが必要である。このように実施する限りにおいて、動物の系統差やロット差による変動をカバーでき、頑健な方法であると思われた。

一方、BrdU 測定については測定キットを使用することから、操作による変動は問題ないと考えがちであるが、キット付属のマニュアルにも幾通りかの操作方法が記載されている（例えば、遠心後の上清の除去、プレートの乾燥法、二次抗体の反応時間）など、測定値が変動する要因があると思われる。このため、操作の自由度を示した詳細なプロトコールが必要であり、適正なプロトコールで測定を制御するならば頑健な方法となると思われた。

#### C-3-8) 動物福祉面からの妥当性

LLNA-BrdU 法は *in vivo* 試験法であり、完全な代替試験法ではない。しかし、LLNA 法と同様に FCA 処置を行わず、また感作成立後に抗原を投与し、抗原・抗体反応を惹起させるステップが無いことから、GPMT などの他の感作性試験と比較して動物に与えるストレスが少ない。使用動物数は LLNA 法が 1 群 5 匹以上（個体別のデータを取得する場合）であるが、LLNA-BrdU 法も同様に 1 群 5 匹以上である。GPMT 法も医薬品

毒性試験法ガイドラインにおいて1群5匹以上が要求されている。これらのことから、LLNA-BrdU法はLLNA法と同等であり、GPMTよりも優れているところがあると考えられる。

#### C-3-9) LLNA-DA法との比較

LLNA-BrdU法はLLNA原法と同じく、リンパ球の増殖を測定指標にしている。動物への適用方法はLLNA原法と同様であり、異なる所はリンパ球の増殖の測定法をRIを使用しないように変更した点だけである。LLNA-DA法において感度を上げるために行われる被験物質投与前の1%SLS処置や被験物質の追加投与を実施しないために、感作誘導についてはLLNA-DA法よりもLLNA原法に近いと考えられる。

一方、リンパ球の増殖の測定部分について見ると、LLNA-DA法ではATP含量の変化を測定しており、試料調製後、ATP測定が短時間でできるが、逆に直ちに測定しなければならないという制約がある。LLNA-BrdU法ではBrdUの取り込み量の測定はATP量よりも操作行程が多くて煩雑であるが、実験を短時間で実施しなければならないという制約はない。ただし、得られるSI値はLLNA原法およびLLNA-DA法に比べて低値になるため、新たな判断基準を設ける必要がある。

#### C-3-10) コストからの妥当性

コストの面については詳しい積算は示されていないが、RIを使用するLLNA原法に比べて、特にコストパフォーマンスが悪いとは思われない。LLNA法はRI施設とシンチレーションカウンターという高価な機器が必要であるが、LLNA-BrdU法ではRI施設は必要なく、測定機器は通常のマイクロプレートリーダーなので、通常の実験施設であれば改めて機器を購入する必要はない。ELISAにおいて、1匹当たり3穴、1群5匹とすると $3 \times 5 = 15$ 穴、試験用量を3段階とすると媒体対照群を含めて $15 \times 4 = 60$ 穴。ブランク穴を含めると、1物質を評価するのに63穴程度は必要であろう。ELISAキットの値段は1000穴分で72800円である。

#### C-3-11) その他の面からの考察

RI標識化合物を用いないこと、また、廃棄物処理の手間がかからないという利点があることから、広く日本の安全性試験で利用されることが期待される。

LLNA-DA法と比較すると操作に時間がかかると思われる。

LLNA法はMaximization法で実施できる交差反応性の検討を行うことができないという欠点があるが、LLNA-DA法やLLNA-BrdU法も同様である。

試験はかならず、休日出勤が必要となる。

#### C-3-12) その他申請者への質問事項

- 1) 他施設の実験成績のところ、富士フィルムの媒体は具体的に何がを、可能なら、示してもらいたい。
- 2) p-Chloroanilineの50%AOO溶液をマウスの耳に塗布した時、皮膚刺激反応は認められたかどうかを示してもらいたい。すなわち、用量反応関係がないのは皮膚刺激によるものか否かを確認させていただきたい。
- 3) LLNA-BrdU法の将来的な普及という観点で、「0、1、2日に感作処置を行い、4または5日にBrdUを投与し、5または6日目にリンパ節を採取」という方法にできないかという意見に対して、可能であれば、この方法の採用に関する可否を科学的に示していただきたい。(休日出勤をしないですむなら、その方が望ましいということがある)

#### C-4) 評価委員会で特に審議した点

##### C-4-1) LLNA-BrdU法開発コンセプトの妥当性について

従来のLLNA法は、リンパ球の増殖反応を測定するために $^3\text{H}$ -Methyl thymidineなどの放射性物質(RI)を使用している。RIの使用は特殊な実験施設を必要とし、放射能汚染、廃棄物の処理の問題など、試験を実施する上で種々の制約をもたらす。本法は従来法の欠点を取り除くために、 $^3\text{H}$ -Methyl thymidineなどの代わりにBrdUを用い、リンパ節細胞の増殖反応を酵素免疫測定法(ELISA)によって検出する「RIを使用しないLLNA法」として開発された。感作誘導法はLLNA法と同一であり、一方でリンパ節細胞の増殖測定における非RI化という有用な改良がなされたことから、LLNAの代替法として妥当と考えた。RI施設を有しない機関でも実施でき、さらに吸光度により測定するため、比較的一般的機器によって試験を実施できるという点で優れていると考えられた。

##### C-4-2) 被験物質の適用範囲の妥当性について

本法が適用できる被験物質の範囲についてはLLNA法と同様と考えられた。

##### C-4-3) 試験法についてのプロトコールの記載について

試験法自体はLLNA法と比べて複雑なものではなく、申請されたプロトコールで概ね理解可能であると考

えられた。BrdU 測定は通常の市販測定キットを使用することから、問題はないと考えられる一方で、ばらつき（測定値への影響）を懸念する指摘も認められた判定基準については当初のものから評価委員会の意見に基づいて修正された。

操作手順の細部に関し、以下の指摘があった。

- 4.5.1.の感作手順の1)「保定者は、人差し指と薬指で尾をはさみ、親指と人差し指で頭部を保定し、耳介を広げて保定する」の記述のうち、人差し指と薬指は小指と薬指の誤りである。
- 動物への感作に2人（保者と実験者）で行うようになっているが、1人でも適用可能である。
- リンパ節をつぶす操作で、ペレットペッスルを使用するようになっているが、より一般的に機械的にメッシュを用いてつぶすなどの操作や表現でも良い。
- ELISA で発色した後、吸光度は時間とともに分単位で速やかに増加するので、時間を決めて反応停止液を加えた方がよい。
- 4.8.4 の測定準備および測定 の10)Washing 操作法は提案されたプロトコールから逸脱しない範囲内において実験者ごとに操作の差が生じやすいので詳細に記述した方が望ましい。
- BrdU 測定については、基本的にはキットを使用するので、大きな問題はないと思いがちである。しかし、キット付属のマニュアルにも幾通りかの操作方法が記載されている部分がある（遠心後の上清の除去、プレートの乾燥法、二次抗体の反応時間など）ので、どの程度まで自由度があるのかを示す必要がある。
- 反応停止液を使用した場合と使用しない場合で差がないかどうかを示す必要がある。リンパ節を凍結保存して後日測定できるとあるが、具体的な保存温度、期限を示す必要がある。
- 判定基準において SD の2倍あるいは3倍をとっていることから、その程度を見やすくするため、申請書の表に示された SE は SD に直すか、SD の項を追加する方が望ましい。
- 判定基準を変更した場合、結果の記録用紙も変更する必要がある。

#### C-4-4) 必要な機器、器具、器材についてのプロトコールの記載について

以下のような指摘があった。

- 4.8.4 測定準備および測定 の11) において、TMB 発色基質を入れてからの時間は、15min と限定せず、5-30min とした方が良いと思われる。また、TMB による発色は、酸性の反応停止液を入れてから、450nm での測定の方が一般的と思われるので、13)として、反応停止液の組成、加える容量も明記した方が良いと思われる。
- 4.8.4 測定準備および測定 の5) において、Fix Denat が BrdU ELISA キットに含まれているのであればその旨を記載するのが望ましい。
- マイクロプレートリーダーで適正に測定できることが確認されている機種例を示してほしい。（過去のバリデーション研究でマイクロプレートリーダーの機種が異なることが試験データのばらつきにつながったことがある。）
- 4.8.3 に使用する器具について、具体的な容量や材質あるいは一般名を記載してほしい。例えば、カップとは？ペレットペッスルとは？チューブの材質や容量、用いるディスプレイピペットの容量、及びナイロンメッシュの孔径とその取り付け方など。
- BrdU 測定キットは1種類に限定されるか、あるいは、他にも使用可能なキットがあるかどうかを示す必要がある。

#### C-4-5) 被験物質の用量について

LLNA 原法と被験物質の濃度や媒体が異なる場合には比較が困難となることから、基本的に LLNA 原法に準じるのが良いと考えられた。その際、設定された濃度において媒体に溶解しない時の濃度設定処置について考慮しておくべきである。なお、被験物質の用量は溶解性だけでなく皮膚刺激性（場合によっては単回投与毒性）も考慮して設定すべきと思われる。

#### C-4-6) LLNA-BrdU 法のプロトコールの問題点について

LLNA-BrdU 法のプロトコール上の問題点について、特に検討されたところを以下に示す。

##### 1) 判定基準について

概ねプロトコールは妥当であるとされたが、判定基準についていくつかの方法が記載されており、最終的にどれを、あるいはどの組み合わせを採用するのか、提案者の考えを明確に示すべきと思われる。

陰性対照群との統計的有意差の有無や陰性対照群の平均と 3SD 離れた場合を陽性と判定するという方法は、試験実施者の技能や実験条件に左右されるデータのバラツキにより、判定が左右され、技能の高い施設では false positive となる可能性が高くなり、技能の低い施設では false negative となる可能性が高くなるという、根本的な矛盾につながる問題があると指摘された。

対照群でのデータのバラツキ

| 対照群のデータを求めた試験<br>における被験物質名            | 平均 OD<br>(4 例) | 平均 | SE*  | SD*  | 95%CL* |
|---------------------------------------|----------------|----|------|------|--------|
| 2,4-Dinitrochlorobenzene              | 0.247          | 1  | 0.29 | 0.58 | 1.91   |
| p-Benzoquinone                        | 0.098          | 1  | 0.11 | 0.22 | 1.35   |
| Diphencyclopropenone                  | 0.095          | 1  | 0.06 | 0.12 | 1.19   |
| Diphencyclopropenone 2                | 0.069          | 1  | 0.04 | 0.09 | 1.14   |
| Glutaraldehyde                        | 0.095          | 1  | 0.06 | 0.12 | 1.19   |
| Glutaraldehyde                        | 0.070          | 1  | 0.2  | 0.4  | 1.63   |
| p-Phenylenediamine                    | 0.073          | 1  | 0.06 | 0.12 | 1.19   |
| p-Phenylenediamine                    | 0.070          | 1  | 0.2  | 0.4  | 1.63   |
| 2-Mercaptobenzothiazole               | 0.153          | 1  | 0.08 | 0.15 | 1.24   |
| cinnamic aldehyde                     | 0.157          | 1  | 0.08 | 0.15 | 1.25   |
| Isoeugenol                            | 0.452          | 1  | 0.12 | 0.24 | 1.39   |
| m-Aminophenol                         | 0.095          | 1  | 0.11 | 0.22 | 1.35   |
| 3-(4-Isopropylphenyl)isobutyraldehyde | 0.115          | 1  | 0.08 | 0.15 | 1.25   |
| Citral                                | 0.070          | 1  | 0.2  | 0.4  | 1.63   |
| Citral                                | 0.066          | 1  | 0.11 | 0.23 | 1.37   |
| Eugenol                               | 0.048          | 1  | 0.23 | 0.46 | 1.73   |
| Hydroxycitronellal                    | 0.145          | 1  | 0.08 | 0.15 | 1.25   |
| $\alpha$ -Hexylcinnamic aldehyde      | 0.157          | 1  | 0.08 | 0.15 | 1.25   |
| Isopropyl myristate                   | 0.077          | 1  | 0.21 | 0.43 | 1.69   |
| Isopropyl myristate                   | 0.069          | 1  | 0.04 | 0.09 | 1.14   |
| 2-Hydroxypropylmethacrylate           | 0.106          | 1  | 0.07 | 0.14 | 1.22   |
| Aniline                               | 0.095          | 1  | 0.11 | 0.22 | 1.35   |
| Glycerol                              | 0.059          | 1  | 0.06 | 0.13 | 1.2    |
| Isopropanol                           | 0.123          | 1  | 0.13 | 0.26 | 1.42   |
| p-Chloroaniline                       | 0.095          | 1  | 0.11 | 0.22 | 1.35   |
| Phthalic acid diethyl ester           | 0.106          | 1  | 0.07 | 0.14 | 1.22   |
| Propylene glycol                      | 0.226          | 1  | 0.23 | 0.46 | 1.74   |
| Dimethyl isophthalate                 | 0.106          | 1  | 0.07 | 0.14 | 1.22   |
|                                       |                |    |      |      |        |
| 平均                                    | 0.119          |    |      |      |        |
| SD                                    | 0.081          |    |      |      |        |
| SE                                    | 0.015          |    |      |      |        |

メモ

\*: SD, SE, 95%CL 対照群の値の平均を 1 としたときの換算値。

28 の対照群のうち、95%信頼限界が 1.5 以上の実験が 5 回あった。

対照群の ELISA の値の最高値と最低値の間で 9.4 倍の差があった。

LLNA原法と同じSI値を指標に取り入れ、感度が低いことを考慮してSI値1.5を判定基準とする案についても検討したが、媒体対照を用いた試験群内の動物間のばらつきを見ると、上の表に示したようにSI値が1.5程度の差が頻繁に認められていることもあり、SI値単独での基準設定は困難であるように思えた。このような判定基準についての問題に対し評価委員会は統計学的有意差が認められ、しかもSIがある一定の基準値を超える場合を陽性とするような組み合わせによる判定基準の設定へ改良案を提示した。下の表は提案者がこの考え方に基づいて、判定した結果を示したものである。これによれば、 $SI \geq 1.5$ という条件をつけ、さらに対照群との統計的有意差がある場合、およびSIが3SD以上であるとした場合、いずれも偽陰性率は6.7%であり、カッパー係数は0.808と最も大きい値を示した。一方、 $SI \geq 2.0$ という条件をつけた場合は、False negativeが20.0%と大きくなった。

$SI \geq 1.5$  であること各種エンドポイントを組み合わせた場合の識別性

|                       | Statistics*1 | ≥95% C.I.*2 | ≥ 2SD*3 | ≥ 3SD*3 | SI ≥ 3*4 | SI ≥ 2.5*4 | SI ≥ 2*4 | SI ≥ 1.5*4 |
|-----------------------|--------------|-------------|---------|---------|----------|------------|----------|------------|
| Concordance           | 91.3         | 87.0        | 87.0    | 91.3    | 82.6     | 78.3       | 87.0     | 87.0       |
| Negative Predictivity | 87.5         | 85.7        | 85.7    | 87.5    | 66.7     | 63.6       | 77.8     | 85.7       |
| Positive Predictivity | 93.3         | 87.5        | 87.5    | 93.3    | 100.0    | 91.7       | 92.9     | 87.5       |
| Prevalence            | 65.2         | 65.2        | 65.2    | 65.2    | 65.2     | 65.2       | 65.2     | 65.2       |
| Sensitivity           | 93.3         | 93.3        | 93.3    | 93.3    | 73.3     | 73.3       | 86.7     | 93.3       |
| Specificity           | 87.5         | 75.0        | 75.0    | 87.5    | 100.0    | 87.5       | 87.5     | 75.0       |
| False positive rate   | 12.5         | 25.0        | 25.0    | 12.5    | 0.0      | 12.5       | 12.5     | 25.0       |
| False negative rate   | 6.7          | 6.7         | 6.7     | 6.7     | 26.7     | 26.7       | 13.3     | 6.7        |
| kappa coefficient     | 0.808        | 0.704       | 0.704   | 0.808   | 0.657    | 0.559      | 0.559    | 0.704      |

\*1: SI>1.5 であり、且つ対照群の SI 値と被験物質群の SI 値とが統計学的に有意差がある時に陽性と判定

\*2: SI>1.5 であり、且つ被験物質の SI 値の平均値が対照群の 95%信頼限界の外にある時に陽性と判定

\*3: SI>1.5 であり、且つ被験物質の SI 値の平均値が対照群の標準偏差の 2 倍あるいは 3 倍以上であるときに陽性と判定

\*4: 被験物質の SI 値の平均値が対照群の値の平均値の 3, 2.5, 2, あるいは 1.5 倍以上であるときに陽性と判定

これらの結果から、最終的な判定基準については、SI 値と統計的手法の組み合わせによる判定とすることに加え、提案者により対照群の 95%信頼限界が 1.5 以上となる例が頻繁に認められることが示されたことを考慮し、対照群の 95%信頼限界が平均値比で 1.5 以下の時に試験が成立するとし、被験物質群の SI 値が 1.5 以上でかつ統計的有意差が認められるときに陽性と判定することが適当であると考えられた。

SI ≥ 2 であること各種エンドポイントを組み合わせた場合の識別性

|                       | Statistics*1 | ≥95% C.I.*2 | ≥ 2SD*3 | ≥ 3SD*3 | SI ≥ 3*4 | SI ≥ 2.5*4 | SI ≥ 2*4 |
|-----------------------|--------------|-------------|---------|---------|----------|------------|----------|
| Concordance           | 82.6         | 82.6        | 82.6    | 82.6    | 82.6     | 78.3       | 87.0     |
| Negative Predictivity | 70.0         | 70.0        | 70.0    | 70.0    | 66.7     | 63.6       | 77.8     |
| Positive Predictivity | 92.3         | 92.3        | 92.3    | 92.3    | 100.0    | 91.7       | 92.9     |
| Prevalence            | 65.2         | 65.2        | 65.2    | 65.2    | 65.2     | 65.2       | 65.2     |
| Sensitivity           | 80.0         | 80.0        | 80.0    | 80.0    | 73.3     | 73.3       | 86.7     |
| Specificity           | 87.5         | 87.5        | 87.5    | 87.5    | 100.0    | 87.5       | 87.5     |
| False positive rate   | 12.5         | 12.5        | 12.5    | 12.5    | 0.0      | 12.5       | 12.5     |
| False negative rate   | 20.0         | 20.0        | 20.0    | 20.0    | 26.7     | 26.7       | 13.3     |
| kappa coefficient     | 0.617        | 0.617       | 0.617   | 0.617   | 0.617    | 0.520      | 0.617    |

\*1: SI>2 であり、且つ対照群の SI 値と被験物質群の SI 値とが統計学的に有意差がある時に陽性と判定

\*2: SI>2 であり、且つ被験物質の SI 値の平均値が対照群の 95%信頼限界の外にある時に陽性と判定

\*3: SI>2 であり、且つ被験物質の SI 値の平均値が対照群の標準偏差の 2 倍あるいは 3 倍以上であるときに陽性と判定

\*4: 被験物質の SI 値の平均値が対照群の値の平均値の 3, 2.5, あるいは 2 倍以上であるときに陽性と判定

なお、結果は、陽性/陰性だけでなく、LLNA 原法の EC3 のように陽性反応を示す濃度域から感作原性の強さ (extreme, strong, moderate, weak, extremely weak) についても評価を加えることが、LLNA 原法の代替法としては求められるので、これに関連した成績と考え方を申請資料に加えることが望ましいと考えられた。

## 2) 動物福祉面からの妥当性について

使用動物数は LLNA 原法が 1 群 5 匹以上 (個体別のデータを取得する場合) であるが、LLNA-BrdU 法も同様に 1 群 5 匹以上である。群数は 3 段階以上としており、これも原法と同様である。

LLNA-BrdU 法は LLNA 原法と同様に *in vivo* 試験法であり、完全な代替試験法ではない。しかし、GPMT 法と比較した場合、LLNA 原法と同様に FCA 処置を行わず、また感作成立後に抗原を投与し、抗原・抗体反応を惹起させるステップが無いことから、動物に与えるストレスが少ないと思われる。

## 3) 対照物質について

LLNA 法では陽性対照として使用されている HCA を使用しているが、その他、Isoeugenol, DNCB などを用いることができるとしている。陽性対照物質の種類と濃度の設定が必要である。LLNA-DA 法の評価の際に、陽性対照はヒトに与える影響が大きいので、陽性対照を用いた試験の頻度を少なくとも良いのではないかと意見もある。

#### 4)媒体について

媒体選択の順番については、プロトコールで特に言及されていない。施設間再現性を良くするためには媒体の選択における優先順位を示すべきと思われる。

#### 5)ELISA を用いる方法の優位性について

リンパ節細胞数など他の指標と比較して ELISA 法を用いるという優位性について説明が必要である。

#### 6) 感作性強度の分類基準について

今回申請書本文には、感作性陽性物質の強度に関する判定基準は記載されていない。これに関連した成績と考え方を申請資料に加える必要がある。

#### 7) 刺激性物質と感作性物質の識別について

提案者の実施したバリデーションでは LLNA 法で false positive となることが知られている刺激性物質（例 Benzalkonium chloride, Sodium lauryl sulfate）が検討されていない。追加バリデーションを行う場合には、これらの物質についての評価を考慮する必要がある。

#### C-5) 特許の状況

今回のプロトコールについては、特許出願されていない。

#### D. 現時点での総合評価

- 1) 評価委員会では LLNA-BrdU 法が C-2-3)で示したような特徴を有し、日本で使用しにくい RI 標識化合物を用いない方法であること、施設内再現性が良いこと、また、原法である LLNA 法とほぼ同等の結果が得られていることから、LLNA 法に置き換わりうる代替法であると思われる。
- 2) 感作性の有無の判断基準は「対照群の 95%信頼限界が平均値比で 1.5 以下の時に試験が成立するとし、被験物質群の SI 値が 1.5 以上でかつ統計的有意差が認められるときに陽性と判定する」ことが適当であると考えられた。
- 3) リンパ節細胞数を計測する方法と比較した時の優位性を確認した上で、バリデーションに進むか否かを判断すべきである。
- 4) 複数の施設で LLNA-BrdU 法が検討され、その妥当性が示されているが、コード化された被験物質を用いていないことなど、OECD 基準に則ったバリデーションではないことから、多施設バリデーションでより詳細なデータを得た上で更に評価する必要がある。
- 5) LLNA 法では偽陰性を示す金属類や偽陽性を示す界面活性剤などが知られているが、LLNA-BrdU 法ではそれらのデータが不足している。
- 6) 詳細なプロトコールが用意されているが、判定基準の修正に加え、BrdU 測定についてさらに詳しく示す必要があるという指摘がある。今回の評価委員会の指摘を踏まえ、修正を行う必要がある。

#### E. 今後行われる多施設バリデーションのあり方について

以下のように考えられた。

- 1) 評価委員の質問に適切な回答が行われた。この回答に沿ってプロトコールや判定基準が適正に変更されることを条件に、多施設バリデーションへの移行は問題ないとする。
- 2) 申請法は原理的に既に OECD で承認された LLNA 法とほとんど変わらないことから、バリデーションにおいては、LLNA 法との類似性を示すための簡易バリデーションが良いと思われる。
- 3) Core laboratory は化学物質評価研究機構に務めてもらい、プロトコールを作成してもらおう。また、技術トランスファーを実施してもらおう。
- 4) すでに技術移管の完了している 4 施設を中心に新規施設を 2~3 施設加えて、実施してみてもどうかという案がある。
- 5) バリデーションを行う施設は LLNA 法の試験経験または LLNA 変法の研究経験を有する施設が良いと思う。
- 6) 評価方法として対照物質を用いる方法（相対的評価）をうまく取り入れた方が吸光度の数値を用いる場合よりも多施設バリデーションに向いているのではないかという意見を含め、検討する。
- 7) 試験期間を 1 月程度としたとき、1 機関で実施可能な被験物質数はプロトコールの内容によって異なるが、陽性対照、陰性対照、被験物質 2 個（1 用量）を 1 セットとした場合、1 週間で実施可能であることから、これを 3 回繰り返すとして、6 検体まで可能と思われる。
- 8) 用量段階は、LLNA 法で用いられている濃度から 3 用量を選定するのが良いと思われる。
- 9) 被験物質候補リストは、提案者の協力を得て作成するのが良いと思われる。なお、LLNA 法で false positive

となることが知られている刺激性物質（例：Benzalkonium chloride, Sodium lauryl sulfate）についての評価も考慮する必要がある。

10) 初めはバイアスがなるべく少なくなるように、条件を揃えて実施するのが良い。

#### F. 引用文献

- Basketter DA, Scholes EW (1992) Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. *Fd Chem. Toxicol.* 30, 65-69.
- Basketter DA, Gerberick GF, Kimber I, Loveless SE (1996) The local lymph node assay: a viable alternative to currently accepted skin sensitization tests. *Food Chem Toxicol.* 34, 985-97.
- Basketter DA, Evans P, Gerberick GF, Kimber I A (2002) Factors affecting thresholds in allergic contact dermatitis: safety and regulatory considerations. *Contact Dermatitis* 47, 1-6.
- Basketter DA, Cadby P. (2004) Reproducible prediction of contact allergenic potency using the local lymph node assay. *Contact Dermatitis.* 50, 15-7.
- De Jong WH, Tentij M, Spiekstra SW, Vandebriel RJ, Van Loveren H (2002) Determination of the sensitising activity of the rubber contact sensitizers TMTD, ZDMC, MBT and DEA in a modified local lymph node assay and the effect of sodium dodecyl sulfate pretreatment on local lymph node responses. *Toxicology*, 176, 123-134.
- Gerberick GF, Cruse LW, Miller CM, Sikorski EE, Ridder GM (1997) Selective modulation of T cell memory markers CD62L and CD44 on murine draining lymph node cells following allergen and irritant treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 146, 1-10, 1997.
- Gerberick GF, Ryan CA, Kern PS, Dearman RJ, Kimber I, Patlewicz GY, Basketter DA (2004) A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis*, 50, 274-288.
- Hariya T, Hatao M, Ichikawa H (1999) Development of a non-radioactive endpoint in a modified local lymph node assay. *Food Chem Toxicol.* 37, 87-93.
- Hatao M, Hariya T, Katsumura Y, Kato S (1995) A modification of the local lymph node assay for contact allergenicity screening: measurement of interleukin-2 as an alternative to radioisotope-dependent proliferation assay. *Toxicology* 98, 15-22.
- Kimber I, Mitchell JA, Griffin AC (1986) Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. *Food Chem Toxicol.* 24, 585-586.
- Kimber I, Basketter DA, Butler M, Gamer A, Garrigue JL, Gerberick GF, Newsome C, Steiling W, Vohr HW (2003) Classification of contact allergens according to potency: proposals. *Food Chem Toxicol.* 41, 1799-1809.
- OECD (1996) Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test methods; ENV/MC/CHEM/TG(96)9.
- OECD (2002) OECD guideline 429 Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, (adopted 24th April 2002)
- Takeyoshi M, Yamasaki K, Yakabe Y, Takatsuki M, Kimber I (2001) Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicol Lett.* 119, 203-8.
- Takeyoshi M, Sawaki M, Yamasaki K, Kimber I (2003) Assessment of statistic analysis in non-radioisotopic local lymph node assay (non-RI-LLNA) with alpha-hexylcinnamic aldehyde as an example. *Toxicology* 191, 259-63.
- Takeyoshi M, Sawaki M, Yamasaki K, Kimber I (2003) Assessment of statistic analysis in non-radioisotopic local lymph node assay (non-RI-LLNA) with alpha-hexylcinnamic aldehyde as an example. *Toxicology* 191, 259-63.
- Takeyoshi M, Noda S, Yamasaki K (2004) Differences in responsiveness of mouse strain against p-benzoquinone as assessed by non-radioisotopic murine local lymph node assay. *Exp Anim.* 53, 171-3.
- Takeyoshi M, Noda S, Yamazaki S, Kakishima H, Yamasaki K, Kimber I (2004) Assessment of the skin sensitization potency of eugenol and its dimers using a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J Appl Toxicol.* 24, 77-81.
- Takeyoshi M, Iida K, Shiraishi K, Hoshuyama S (2005) Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitizing potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J Appl Toxicol.* 25, 129-134.
- 医薬品非臨床試験研究会監修(2002), 医薬品非臨床試験ガイドライン解説 2002, 薬事日報社.
- 武吉正博 (2003) Murine Local lymph node assay (LLNA) の非 RI 化の試み、日本実験動物技術者協会 九州支部会報 No.27, pp1-5.

以上

皮膚腐食性試験バリデーション SOP

1. 試験に使う器材及び試薬 (2キット使用: 本試験の場合)

試験施設で準備するもの: ピペットマンまたはマイクロマン (100  $\mu$ L)、1 mL および 5 mL ピペッター、吸引除去装置、0.1 mg まで計れる化学天秤、時計、ストップウォッチまたはタイマー、20mL 容ビーカーまたは 6 well プレート 12~24 個、ピンセット (先端が細いもの。但し、とがっていないもの)、絶縁テープ (シーリングテープ、パラフィルムでも良い)、ペーパータオル、イソプロパノール、蒸留水 (市販品、自家製の脱イオン水でも良い。)、燐酸緩衝液 (PBS、0.01mol/L Phosphate Buffered Saline (-) 和光 164-1851、pH 7.4 であれば自家製のものや他社のものでも良い) 約 800 mL、MTT 溶液 (キットの培養液で 0.5mg/mL にて必要量を用事調整)

大野より送付: MTT、陽性対照物質 (水酸化カリウム 10% 水溶液、塩化ベンザルコニウム、20% SLS)、被験物質 (10 検体)、96 well、24 well、および 6 well プレート各 4~50 枚

クラボウより送付: EpiDerm 必要数、画鋸 (頭が  $\Phi$ 7.7mm 以下で断端が若干膨らんでいるもの、6ヶつつ送付)、

ゲンゼより送付: Vitrolife-Skin 必要数、直径 6 mm ポンチ、木槌、カッティングマット

2. 使用機器・場所

CO<sub>2</sub> インキュベーター、冷蔵庫、マイクロプレートリーダー、クリーン度の高い場所、無菌操作は必ずしも行わなくてよい。

3 試験方法

1) EpiDerm の場合、送付されてきたキットの梱包を解き、培養皮膚モデル (以下、モデルと記す) の入った 24 well プレートの状態を確認する。使用まで冷蔵保管 (48 時間以内)。使用前にモデルと付属の培養液を 37°C で温める。6 well プレート 4 枚の well にそれぞれ培養液 1 mL を加え、モデルを各 well に置く。

2) Vitrolife-Skin の場合、送付されてきたキットの梱包を解き、モデルの入った 24 well プレートを 37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れる。付属の培養液を 37°C で温める。1 時間後、6 well プレート 4 枚の well にそれぞれ培養液 1 mL を加え、モデルを各 well に置く。当日試験を開始できない場合には、この状態で 1~2 日間 37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養する。(注意: 冷やしてはいけない)

以後は各モデル共通の操作となる。

5) 試験前のモデルの確認 (well に穴や明らかに薄い部分があるような異常な well は使用しない。また、水滴等があれば、モデルを傷つけないように濾紙等で除去する)



6) 被験物質を適用 (希釈等の操作は不要)

100  $\mu$ L 又は 100 mg をキット上部に適用。

N=2 に適用。Vitrolife-Skin ではコラーゲンゲルのみのモデル(n=1)にも適用する。これについての操作は細胞を含むモデルと同様に行う。

物性による適用方法：①粉体：被験物質を事前に計りこんで薬包紙に包んでおく (用時処理)。薬包紙等で作成した軽い漏斗を用いて well に適用後、画鋸の後ろで軽く押さえる。吸水性がある場合には、化学天秤上で計り込む。

②固体：(40-50 $^{\circ}$ C の熱をかけて溶ける場合) 37 $^{\circ}$ C 前後で溶液ならば、溶液として適用する。

③固体 (その他)：乳鉢などを用いて均一な粉にし、①の方法で適用。

④クリーム・ゲル状 (低粘度)：マイクロマンなどで計り取る。マイクロマン未使用の場合には、被験物質を計りこんだ後、画鋸の後ろで軽く押さえる。

⑤クリーム・ゲル状 (高粘度)：被験物質を計りこんだ後、画鋸の後ろで軽く押さえる。

⑥溶液：ピペットマンを用いて 100  $\mu$ L 適用。

溶媒対照：蒸留水、陽性対照液はピペットマンを用いて 100  $\mu$ L 適用。塩化ベンザルコニウムは①の方法で適用。

7) 被験物質順に適用し、3分、60分間処理を行う。処理は常温(15-25 $^{\circ}$ C)。

8) 10mL 以上の PBS で 2 回洗浄。モデルをピンセットで摘み、かたむけて被験物質をペーパータオルにしませた後、2~3 回 PBS 液中でふってすすぐ。これを 2 回繰り返す。PBS は被験物質、処理毎に交換する。3分処理の洗浄に用いたピーカーは、そのまま同じ物質であれば、次の 60 分間処理に用いても良いが、PBS は交換する。

9) モデルを 0.3mL の PBS の入った well に移す。

8) 全被験物質の処理が終わった後モデルをペーパータオル上でよく PBS を切った後、MTT 0.5 mg/mL を含む培養液 (EpiDerm の場合には 0.3 mL、Vitrolife-Skin では 1mL) の入った 24well プレートにモデルの下部に空気を入れないように移す。EpiDerm

9) 37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub> インキュベーターに 3 時間入れる。

10) モデルを Well から取り出し、10 mL 以上の PBS の入った 2 つピーカー中で順次 2 回洗う。

11) EpiDerm ではペーパータオル上で PBS をよく切り、別の 24 well プレートにモデルを移す。Vitrolife-Skin の場合には、移す前に直径 6 mm のポンチで適用部を打ち貫き、ペーパータオル上で PBS をよく切り、別の 24 well プレートにモデルを移す。イソプロパノールを EpiDerm の場合には 2 mL、Vitrolife-Skin では 1 mL 加えて、フォルマザンを抽出する。

12) 水滴が入らないように、シールして冷蔵庫にて一晩保存。

13) ピペッティングにより均一化した抽出液を 96 well プレートに 200  $\mu$ L /well ずつ移す。

14) マイクロプレートリーダーを用いて、OD540 または 570 の吸光度を測定。イソプロパノールのみも well に加え、ブランクとする。

15) 生データをデータシートに入力。溶媒対照を 100%として、3分、60 分間処理における平均生存率を計算。

$$\text{生存率} = 100 \times (\text{処理モデルの吸光度} - \text{blank}) / (\text{陰性対照の吸光度} - \text{blank})$$

16) 判定モデル

腐食性有り：被験物質を適用した2つの well の生存率を平均値が3分で生存率50%未満、或いは、3分で生存率50%以上、60分間で15%未満吸光度と判定結果をデータシートに記載。

以上

#### <注意事項>

1. 無理な計画を立て、操作を誤らないようにする。
2. 分刻みとなる処理記録の記載を忘れずに。なお、処理モデルの洗いに時間がかかり、処理時間が延びてしまう場合もあります。そのような場合は 正確に処理時間を記録する。
3. 計量による適用では 100±5 mg の範囲を許容範囲とします。正確に適用量を記載する。
4. 液体の場合、その粘性や重みにより正確な量を適用できないことがあるので、そのような場合は注射用シリンジ等、正確な液量を適用できる器材を使用する。
5. well への薬物の適用間隔は 30 秒以上とることが望ましい。粉体は特に時間がかかる。
6. MTT 溶液の作成に際しては超音波処理して完全に溶解する。
7. Vitrolife-Skin では腐食性物質を適用した場合、リングがモデルからはずれることがある。その場合はゲルの端をピンセットで持ち、以後の操作を遂行する。

平成 16 年 1 月 27 日第五稿  
小島肇夫作成

操作手順一例  
(本試験の場合)

第一日目

時刻

操作内容

10:30

キット到着 キット梱包を解き、内容及びモデル状態の確認。  
培養液の 37℃保温。

11:00

試験準備 必要な試薬、被験物質、材料の用意。MTT を計りこみ、必要量の培養液にて 0.5 mg/mL に溶かす (MTT 培養液)。微温湯で温めるか、ミキサーを使用して溶かす。24 well プレート 2 枚分では、EpiDerm (EPI) で 20mL、Vitrolife-Skin で 60 mL 作製する。

11:30

6 well プレート 16 枚の各 well に培養液 1 mL を加える。

11:45

一へ移す

各 well にモデルを移し、プレートを 37℃、CO2 インキュベーターへ移す

12:00~13:00

昼食

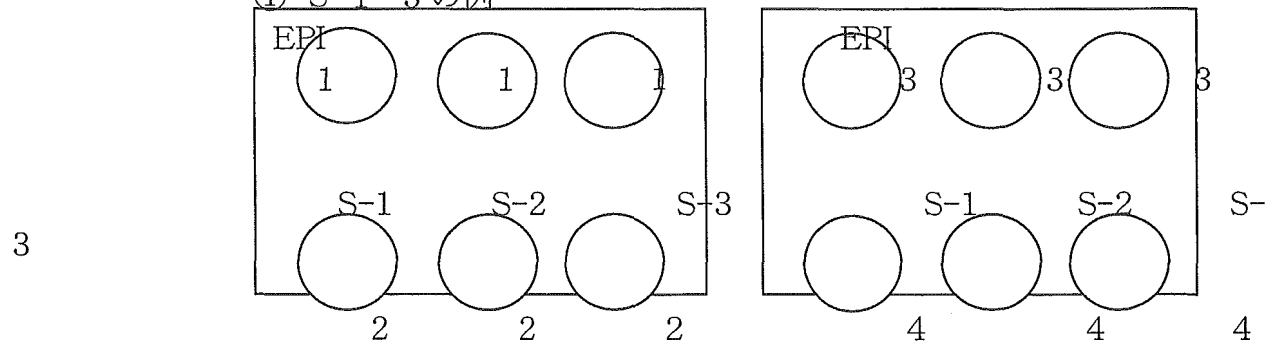
13:00

12 物質を 2 回洗浄するため、20 mL 容ビーカーを 12 個用意して、各ビーカーに 10 mL の PBS を加える。MTT 培養液を 24 well プレートの 2 枚に加える。EPI は well に 0.3 mL 加える。6 well 及び 24 well プレートの蓋にキット記号、被験物質番号を記載。粉体の被験物質 100 mg を計り、各物質 8 包作る。

13:30

EPI への被験物質適用 (3 物質毎に実施) 適用順は被験物質の物性で各自判断する。

① S-1~3 の例



3 分間処理

60 分間処理

- ② S-1 を 1 → 3 → 2 → 4 の順に 15 秒毎に被験物質を適用する。
- ③ 3 分処理時間終了後、3 分間処理プレートを 1 → 2 の順に 30 秒毎に PBS で洗浄する。
- ④ 10 mL の PBS で 2 回洗浄。すなわち、モデルをピンセットで摘み、かたむけて被験物質をペーパータオルにしませた後、2~3 回 PBS 液中でふってすすぐ。これを 2 回繰り返す。PBS は被験物質、処理時間毎に交換する。3 分処理の洗浄に用いたビーカーは、そのまま同じ物質であれば、次の 60 分間処理に用いても良いが、PBS は

交換する。その後、ペーパータオルなどでよく水を切った後、MTT 培養液の入った 24 well プレートに移す。EpiDerm の場合にはモデルの下部に空気を入れないように移す。

⑤ 60 分処理はそのまま室温放置とする。

13 : 34

S-2 実施

↓ 以後 S-10 まで、次に陽性対照物質、蒸留水を 4 分毎に適用

14 : 20

適用終了。3 分処理用の 24 well プレートをインキュベーターに入れる。

14 : 30

①60 分処理時間終了後、S-1 の 60 分間処理プレートを 3→4 の順に 30 秒毎に PBS で洗浄する。

②PBS による洗浄方法としては、3 分処理時と同じ。その後、MTT 培養液につける。

15 : 20

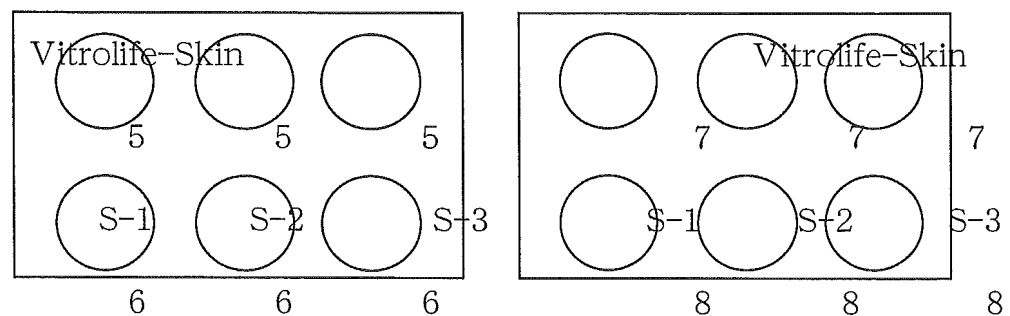
60 分処理用の 24well プレートをインキュベーターに入れる。

↓ MTT 培養液を 24well プレートの 2 枚に加える。Vitrolife-Skin は Well に 1.0mL 加える。6well 及び 24well プレートの蓋にキット記号、被験物質番号を記載。

15 : 30

Vitrolife-Skin への被験物質適用（3 物質毎に実施）適用順は被験物質の物性で各自判断する。

①S-1～3 の処理



3 分間処理

60 分間処理

②S-1 を 5→7→6→8 の順に 15 秒毎に被験物質を適用する。

③3 分処理時間終了後、3 分間処理プレートを 5→6 の順に 30 秒毎に PBS で洗浄する。

④10mL の PBS で 2 回洗浄。MTT 培養液の入った 24well プレートに移す。

⑤60 分処理はそのまま室温放置とする。

15 : 34

S-2 実施

↓ 以後 S-10 まで、次に陽性対照物質、蒸留水を 4 分毎に適用

16 : 20

適用終了。3 分処理用の 24well プレートをインキュベーターに入れる。

16 : 30

①60 分処理時間終了後、S-1 の 60 分間処理プレートを 3→4 の順に 30 秒毎に PBS で洗浄する。