

A. 目的

医薬品等の皮膚感作性は主に Guinea Pig Maximization Test 法 (GPMT 法)、Buehler Test 法 (BT 法) やその変法などで評価されてきたが、試験期間が GPMT 法で 24 日、BT 法で 38 日程度と長く、作業負荷やコストが多いため面や長時間の閉塞貼付や Freund' s Complete Adjuvant の使用など動物にストレスを与えることによる動物愛護の面で問題もあり、新しい方法が求められてきた。最近、これらの点を解消する試験法として 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 ^3H 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、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) の取り込みをみる方法 (Takeyoshi et al, 2003) も報告されているが、まだ、十分にバリデートされていない。一方、ダイセル化学工業 (株) の山下と出原は ATP 含量を測定する方法 (LLNA-DA 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) に新しい動物実験代替法として応募した。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、かつ比較的短期間の方法であり、評価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 年度より検討を行った。その結果、本試験法は原法である LLNA 法とほぼ同様の原理による方法であること、ほとんど同一の識別能力を持つこと、RI を用いないこと、簡便であり、比較的短期間で結果が得られ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再現性についての情報を得る必要があることから、多施設バリデーションの実施を代替法学会に依頼した。代替法学会のバリデーション委員会はこの依頼を受け、LLNA-DA 法バリデーション研究実行委員会を組織し、バリデーション研究を行った。本二次評価は、このバリデーション研究報告書並びに関連して収集した情報に基づき、LLNA-DA 法が LLNA 法の代替法として妥当であるか否かを評価するものである。

B. 評価方法

B-1) 評価組織

一次評価書に記載した。

なお、一次評価の際の委員であった金澤由基子、五十嵐良明および牧栄二は今回の評価の対象となったバリデーションに参画したことから、二次評価には関与しなかった。

B-2) 提案者

一次評価書に記載した。

B-3) 秘密の保持と評価結果の公表について

一次評価書と同一であることから省略

B-4) 評価に使用した資料および会議資料

二次評価に使用した資料について、以下に示した。

資料 1) ダイセル化学工業 (株) より提案のあった皮膚感作性試験代替法 (LLNA-DA 法) の一次評価報告書

資料 2) LLNA-DA 法バリデーション研究報告書 (概括) Version 10 (2007. 5. 18)

資料 3) LLNA-DA 法バリデーション研究 (第 1 実験) 報告書 Version 2. 1 (2007. 6. 27)

資料 4) LLNA-DA 法バリデーション研究 (第 2 実験) 報告書 Version 1. 1 (2007. 6. 27)

資料 5) LLNA-DA 法バリデーション研究結果報告 (説明資料)

資料 6) LLNA-DA 法による 31 物質の評価結果 (ダイセル化学工業株式会社評価解析センター 出原賢治、2007. 11. 8)

資料 7) LLNA 法バリデーション研究における追加資料 被験物質の溶媒中での安定性に関する検討結果 (ダイセル化学工業株式会社 評価解析センター 出原賢治、津野真澄、2007. 11. 8)

資料 8) 平成 19 年度第一回評価委員会議事録

資料 9) 平成 19 年度第二回評価委員会議事録

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、代替法学会のバリデーション委員長であり、LLNA-DA 法バリデーション実行委員長である大森崇博士よりバリデーションの計画と実施経過および結果について説明を受けた。その報告について、質疑応答を行った上で、LLNA-DA 法の再現性について評価を行った。また、今回のバリデーションの結果、および申請者であるダイセル化学工業 (株) より提供を受けた資料を合わせて、LLNA 法の代替法としての評価を行った。

なお、多施設バリデーションへの参加施設および被験物質は以下のとおり。参加申し込み施設が多かったことから、2 回に分けてバリデーションが行われた。

B-6) バリデーション参加者および参加施設名 (表 1)

バリデーション参加施設は表 1 に示したように 23 施設であり、それぞれの施設の代表者は、LLNA-DA 法バリデーション実行委員として計画の立案、実行、データ解析に関与した。このうち、17 施設が実験を行う施設となった。これは当初、バリデーション委員会が参加施設を公募したところ、19 施設がバリデーション研究の参加を希望した。しかしながら、一度にこれだけの施設に動物および測定器の供給を行うことが不可能であったために、実験施設を選択せざるを得なかった。そこで、LLNA 法やそれに準じた試験法を実施した経験の有無、代替法学会のバリデーション委員会の評価委員会に委員が属するか否か、6 物質の被験物質が実施できるか否か、後に実施されることになっていた LLNA 法の別の変法である LLNA-Brdu 法への参加を希望するか否か、測定機器の所持状況などが勘案され、最終的に 2 回の実験に分け、第 1 実験では 10 施設、第 2 実験では 7 施設がこのバリデーション研究の実験を行う施設となった。

B-7) 被験物質名 (表 2)

第 1 実験で用いられた 12 種の被験物質および第 2 実験で用いられた 5 種の被験物質を表 2 に示した。

C. バリデーシヨンの結果および考察

C-1) 被験物質の選択

第1実験では陽性物質8種 (A: 2,4-dinitrochlorobenzene、B: hexylcinnamic aldehyde、C: 3-aminophenol、D: glutaraldehyde、E: cobalt chloride、F: isoeugenol、G: formaldehyde、K: abietic acid)、陰性物質4種 (H: dimethyl isophthalate、I: isopropanol、J: nickel sulfate、L: methyl salicylate) が用いられた。

第2実験では陽性物質3種 (B: hexylcinnamic aldehyde、E: cobalt chlorideとN: potassium dichromate)、陰性物質2種 (J: nickel sulfate、M: lactic acid) が用いられた。LLNA法の文献値より、A、Dは非常に強い感作性物質、E、G、Nは強い感作性物質、B、C、Fは中程度の感作性物質、Kは弱い感作性物質、H、I、J、L、Mは感作性陰性物質とされている。また、JはLLNA法では陰性と報告されているが、ヒトで多くの臨床例があり、感作性陽性であることが明確になっている。

即ち、重複しているものを一つと数えると、陽性物質9物質、陰性物質5物質を用いており、評価委員会はLLNA-DA法によるSI値の施設間再現性、並びにLLNA法陽性物質、陰性物質の判別の施設間再現性を評価することは可能であると判断した。しかし、LLNA法との結果の対応性を含む、皮膚感作性試験としての全般的な能力を評価する上では不十分であり、申請者から提出されたデータを含めて評価することとした。

C-2) 被験物質の取り扱い

本バリデーシヨン研究では試料等手配担当者が被験物質を媒体に一定濃度に溶かしたものを各施設へ配布しているため調製から投与までに日数(最大20日間)が経過していることが、被験物質の安定性の観点で注目された。バリデーシヨン研究報告書ではこれに関連する考察が不足しており、評価委員会で考察することとした。被験物質調製時には高濃度のJ(nickel sulfate)とK(abietic acid)を除いて残り全ての被験物質が溶解していたのに対し、投与時には6物質で析出、沈殿が生じていた。即ち、第1実験では、被験物質C(3-aminophenol)、E(cobalt chloride)、H(dimethyl isophthalate)、I(isopropanol)、J(nickel sulfate)、K(abietic acid)において、送付前の調製時に認められなかった析出や沈殿が投与時に認められた(LLNA-DA法バリデーシヨン研究(第1実験)報告書表3.2.2.及び3.3.1)。その際、H(dimethyl isophthalate)とI(isopropanol)については施設により析出・沈殿の現れ方に差が認められた。また、E(cobalt chloride)とJ(nickel sulfate)は、沈殿を超音波処理により溶解させて投与した施設と懸濁液で投与した施設があった。被験物質の調製時には溶解した物質が施設に送付され、析出、沈殿を生じ、その析出物が再溶解しづらくなる現象があったようである。これらにより、投与時の被験物質溶液が名目上の濃度より低下している可能性が考えられ、試験結果の検討の際には考慮しなければならないと考えられた。

溶媒の性質については、バリデーシヨン研究(第1実験)報告書の20ページには「被験物質を入れた容器がプラスチックであったため、溶媒としてacetone/olive oil(A00)を用いると容器が溶ける可能性が示唆された」との記載がある。そのため、溶媒中の被験物質の安定性を検討する前に、溶けた容器の成分が直接、ATP発光量に影響を与える可能性が懸念された。そこで、溶媒対照群のデータのうちA00を用いた群

と他の溶媒を用いた群に着目した。なお、DMSO塗布群ではDMSO自体によりATP発光量が上昇するので、A00塗布群とacetone塗布群を検討した。その結果、同一溶媒を用いた施設間の差の方が、異なる溶媒を同一施設内で用いた際の差より大きいと考えられることから、溶媒の違いによって反応性に大きな差があるとはいえないと考えられた。このことにより、仮に容器の成分が溶けたとしても、容器の成分が直接、ATP発光量に影響を与えるとはいえないと考えられた。しかし、溶けた容器の成分が被験物質の溶解性に影響を与え、試験結果に影響する懸念がある。E (cobalt chloride)は、第1回のバリデーションで全ての施設で析出、沈殿が認められたが、輸送容器をプラスチック容器からガラス容器に変えた第2回目では沈殿は認められなかった。このことは第1実験においては、容器 (の溶けた成分) が被験物質の析出、沈殿に影響を与えている可能性を示唆するものと考えられる (第2実験では輸送容器をガラス製にしたためこのような容器による懸念は無いと考えられる)。第2実験では被験物質B、E、M、Nはいずれも調製時の被験物質の状態と投与時の状態は一致していた (LLNA-DA法バリデーション研究 (第2実験) 報告書表3.2.2. 及び3.3.1)。J (nickel sulfate)については調製時に高濃度においてのみ懸濁状態であったが、投与時には全ての濃度で沈殿等の変化が認められ、超音波処理し懸濁液として投与された。N (potassium dichromate)については凝固等の変化が認められたが、溶解させた後に投与された。

被験物質の安定性に関する評価委員会での議論について、ダイセル化学工業 (株) より B (hexylcinnamic aldehyde)、C (3-aminophenol) および K (abietic acid) は調製後 22 日間にわたり安定であったとの結果が提供された (LLNA 法バリデーション研究における追加資料 被験物質の溶媒中での安定性に関する検討結果 2007. 11. 8)。このデータにより、バリデーション試験時には、これら 3 被験物質が定められた媒体中で安定であるという結果が示された。しかしながら、容器が溶ける可能性を考慮に入れ、同じ容器、同じ保管条件を用いた安定性試験結果ではなかった。実際に第1実験の時に被験物質調製時の物質の状態と投与時の状態とが異なっているという情報がバリデーション研究報告書中に記載されているため、この提供された結果のみをもって、第1実験において調製時と同じ状態の被験物質が試験施設で投与に供されたことの保証にはならないと考えられた。

変質のない被験物質が試験施設に配布され投与に供されることにより、施設間再現性、LLNA との一致性の検討が可能となるため、この間の安定性に懸念がある場合には慎重に評価を進める必要がある。評価委員会は、すでに終了した実験結果を知った後に、問題のありそうな物質を除くことはバリデーション評価として妥当性に欠くことから、計画した通りの全体で評価することを基本とし、追加検討として物質の安定性に問題がないと推定される物質のみでも施設間再現性を考察し、双方を総合的に勘案して結論をもつこととした。なお、安定性に問題がないと推定される物質としては、調製時の状態と投与時の状態が一致していることを重要視し、第1実験では A (2,4-dinitrochlorobenzene)、B (hexylcinnamic aldehyde)、D (glutaraldehyde)、F (isoeugenol)、G (formaldehyde)、L (methyl salicylate)、第2実験では B (hexylcinnamic aldehyde)、E (cobalt chloride)、M (lactic acid)、N (potassium dichromate) とした。被験物質の安定性についてのまとめを表3に示した。

C-3) LLNA-DA法によるSI値の施設内再現性

施設内再現性については、第1実験および第2実験において陽性対照物質である25% hexylcinnamic aldehydeを用いて検討した。その結果、それぞれの報告書の図3.5.2および表3.8.1で示されたように、 $\exp(\tau^2)$ は一番大きかった施設においても1.05であり、ほとんどの施設で最小値の1に近い値であった。

これらの結果から、評価委員会はLLNA-DA法の施設内再現性は良好であると判断した。

C-4) LLNA-DAによるSI値の施設間再現性

12物質を用い、10施設で行われた第1実験では、指標として用いた $\exp(\tau^2)$ が1.00~4.15の値であったが、飛びぬけて大きな値を示したのはE(cobalt chloride)とJ(nickel sulfate)の高濃度(順に、2.64、4.15)だけであり、E、JおよびD(glutaraldehyde)の中濃度(1.36)を除き、全て1.2以下であった(第1実験報告書:表3.7.1)。なお、 $\exp(\tau^2)$ 値とはバリデーシンの試験でのSI値から算出したばらつきの指標であり、1.2は施設間差が小さくないと認めうる基準値として、バリデーション研究報告書で提案されている値である。一方、5物質を用い、7施設で行われた第2実験ではE(cobalt chloride)を含め、全て $\exp(\tau^2)$ が1.2以下であった。第1実験におけるE(cobalt chloride)、J(nickel sulfate)は、いずれも2施設が懸濁液として、1施設が超音波処理により溶解確認後に溶液として投与したと報告されており、投与液の状態の差が施設間のばらつきに影響していると考えられた。

評価委員会において安定性に問題ないと推定した被験物質で同様な検討を行ったところ、第1実験におけるD(glutaraldehyde)の中濃度を除き、第1実験と第2実験の全てにおいて $\exp(\tau^2)$ が1.2以下であった。

これらの結果から、評価委員会はLLNA-DA法の施設間再現性はおおむね良好であると判断した。

C-5) LLNA-DA法による感作性の有無の評価の施設間再現性

10施設の参加で行われた第1実験において(表4-1)、陽性物質として用いたA(2,4-dinitrochlorobenzene、10施設)、B(hexylcinnamic aldehyde、10施設)、F(isoeugenol、3施設)、およびK(abietic acid、3施設)はいずれの施設においても陽性と判定された。しかし、同様に陽性物質として用いたD(glutaraldehyde)、E(cobalt chloride)、G(formaldehyde)は3施設中1施設が陰性と判定され、C(3-aminophenol)は3施設とも陰性と判定された。このうち、E(cobalt chloride)とC(3-aminophenol)については析出、沈殿が認められており、実質の濃度の低下が原因となり陰性となった可能性が考えられた。一方、陰性物質については、H(dimethyl isophthalate、3施設)、I(isopropanol、10施設)、L(methyl salicylate、3施設)はいずれの施設でも陰性と判定されたが、J(nickel sulfate)は3施設中1施設が陽性と判定された。J(nickel sulfate)は、析出物を超音波処理して溶解確認後に投与した施設では陽性を示し、懸濁適用した2施設はそれぞれ陽性、陰性となり、ばらつきが認められていた。同じく溶解状態や懸濁状態が原因となって陽性、陰性を分けた可能性が考えられた。本物質はLLNA法陰性の報告が多いが、LLNA法で陽性とのRyanらの報告(Food Chem. Toxicol 40, 1719-1725, 2002)もある。

一方、7施設の参加で行われた第2実験では(表4-2)、陽性物質であるB(hexylcinnamic aldehyde)、

N (potassium dichromate) は7施設、全てで陽性と判定され、陰性物質であるJ (nickel sulfate)、M (lactic acid) は4施設、全てで陰性と判定された。陽性物質であるE (cobalt chloride) については、4施設の結果が陽性2施設、陰性2施設に分かれた。

評価委員会において安定性に問題ないと推定した被験物質で同様な検討を行ったところ、第1実験においては、陽性物質として用いた被験物質A (2,4-dinitrochlorobenzene、10施設)、B (hexylcinnamic aldehyde、10施設) およびF (isoeugenol、3施設) はいずれの施設においても陽性と判定された。しかし、同様に陽性物質とされているD (glutaraldehyde)、G (formaldehyde) は3施設中1施設において陰性と判定された。陰性と判定した1施設における高濃度のSI値はDが2.57、Gが2.69と3を超えないものの3付近の値であり、いずれも3用量の値に用量反応関係があるので、現実実験が行われる場合には仮に陰性と判定された場合、より高い用量での再実験が行われると思われることから、この不一致は実際的には大きな問題にならないと考えられた。一方、陰性物質については、I (isopropanol、10施設)、L (methyl salicylate、3施設) はいずれの施設でも陰性と判定された。

第2実験では陽性物質であるE (cobalt chloride) の判定が陽性と陰性、2施設対2施設に分かれた。被験物質Eは、第1実験では塗布操作の影響と考えられる大きなばらつきが認められたが、第2実験では改善され、ばらつきは小さくなった。第2実験で施設間に評価の差が生じたのはSI値が最高濃度の5%でもSI値3を超えないが3付近であるためと考えられる。3用量の値に用量反応関係があるので、現実実験が行われる場合にはより高い用量での再実験が行われると思われ、実際的には大きな問題にならないと考えられた。

C-6) LLNA-DA法の感度、特異性、予測性、正確性

第1実験の結果を表4-1、第2実験の結果を表4-2にまとめた。また、第1実験の結果を参加施設の結果を被験物質毎に集計し、多数施設での判定をもとに、LLNA-DA法の結果をLLNA法の結果と比較したところ(表4-3)、感度 (sensitivity: 陽性物質を陽性と判定する能力) 87.5%、特異度 (specificity: 陰性物質を陰性と判定する能力) 75.0%、陽性検出力 (positive predictivity: 陽性との結果が得られた物質が陽性である割合) 87.5%、陰性検出力 (negative predictivity: 陰性との結果が得られた物質が陰性である割合) 75.0%、正確性 (accuracy: 判定結果が正確である割合) 83.3%であった。なお、評価委員会において安定性に問題ないと推定した6被験物質 (陽性5物質、陰性1物質) で同様な検討を行ったところ、LLNA法とLLNA-DA法の結果は全て一致した。

第2実験では施設により評価が半数ずつ陽性と陰性に分かれたE (cobalt chloride) を除き、4被験物質 (陽性2物質、陰性2物質) を用いて検討したところ、LLNA-DA法の結果とLLNA法の結果は一致した。

評価委員会はLLNA-DA法によるE (cobalt chloride) の結果から考えて金属類の評価においてLLNA-DA法はLLNA法と同等の結果が得られないことがあると考えたが、それ以外の物質においては、ほぼ同等な評価を行えるものと考えた。なお、C (3-aminophenol) については、安定性の問題があり、偽陰性物質と断定することはできなかった。最終的に、バリデーションで用いた14物質の結果と一次評価報告書に書かれている情報だけでは被験物質が少なく、LLNA-DA法の総合的な代替の可能性について結論できず、LLNA法とLLNA-DA法の両者の結果のある物質についてのデータを現時点で集め、合わせて以下に検討した。

D. 申請者の提出データをあわせた解析結果に基づく LLNA-DA 法による代替可能性の考察

申請者は 31 物質についての自家試験結果をまとめて評価委員会に平成 19 年 11 月 8 日に提出した。それによれば、表 5-1 および表 5-2 に示したように、LLNA 法で陽性と報告されている 20 物質のうち mercaptobenzothiazol を除く 19 物質について LLNA-DA 法で陽性であった（感度 95.0%）。また、LLNA 法で陰性とされた 10 物質のうち benzalkonium chloride を除いた 9 物質で LLNA-DA 法で陰性との結果が得られた（特異性 90.0%）。陽性検出力は 95.0%、陰性検出力は 90.0%、正確性は 93.3%であった。また、モルモットを用いた皮膚感作性試験法（GPMT/BT）やヒトでの皮膚感作用性試験法（HMT/HPTA）結果と比較しても良好な対応があることが示され、LLNA-DA 法がこれらの皮膚感作性試験法を代替できる可能性は LLNA 法とほぼ同程度であると考えられた。

今回のバリデーションでは新たに加えた 3-aminophenol がおそらく安定性が原因となって偽陰性になり、cobalt chloride において施設間で評価の違いが認められ、その他若干の施設間での違いが認められたが、申請者の結果とほぼ同等の結果が得られた。これらの結果から、評価委員会では、金属類あるいは mercaptobenzothiazol に構造的に近い物質などの中に注意すべき物質があると思われるが、LLNA-DA 法は LLNA 法による感作性の有無の評価の代替法になり得るものと判断した。

E. LLNA-DA の最終評価まとめ

申請者の提出資料に基づく情報および代替法学会に委託したバリデーションの結果、LLNA-DA 法は、欧米に比較し RI の管理に厳しい本邦でも容易に実施できることから LLNA 法に比較して利点があると判断された。また、LLNA-DA 法は施設内再現性および施設間再現性が高く、LLNA 法との結果の対応性が高く、皮膚感作性を評価する LLNA 法の代替として有用であると判断された。

以上

表1：LLNAバリデーション実行委員および所属施設

	氏名	所属施設	役割	担当*
1	大森 崇	京都大学大学院医学研究科医療統計学分野	委員長	データ解析
2	小島 肇	国立医薬品食品衛生研究所薬理部	委員	被験物質供給
3	寒水孝司	大阪大学臨床医工学融合研究教育センター	委員	データ解析
4	吉村 功	東京理科大学工学部経営工学科	委員	データ解析
5	出原賢治	ダイセル化学工業（株）評価・解析センター	委員	申請者、実験実施
6	五十嵐良明	国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部	委員	実験実施
7	金澤由基子	（財）食品薬品安全センター秦野研究所 医療用具試験室	委員	実験実施
8	武吉正博	（財）化学物質評価研究機構安全性 評価技術研究所研究第一部	委員	実験実施
9	小坂忠司	（財）残留農薬研究所 毒性部	委員	
10	浦谷 衛	石原産業（株）中央研究所 安全科学研究室 安全性グループ	委員	実験実施
11	山中 淳	ピアス（株）中央研究所 ARI 評価グループ	委員	実験実施
12	篠田伸介	（株）薬物安全性試験センター埼玉研究所 第二毒性部	委員	実験実施
13	中村洋介	住友化学株式会社 情報電子化学業務室	委員	実験実施
14	青儀 巧	大塚製薬（株）徳島研究所 安全性研究センター 第2研究室	委員	実験実施
15	米田知史	トーアエイヨー（株）研究開発部 福島研究所	委員	実験実施
16	花田智彦	日本新薬（株）創業研究所 安全性研究部	委員	実験実施
17	猪田健人	中野製薬（株）マーケティング本部研究	委員	
18	田中正志	明治製薬（株）医薬開発部門 動態安全性研究所	委員	実験実施
19	有馬和範	大正製薬（株）安全性研究所	委員	実験実施
20	宇佐美雅仁	ホーユー（株）総合研究所 基盤技術研究室	委員	実験実施
21	篠田直樹	参天製薬（株）奈良研究開発センター	委員	実験実施
22	湯浅敦子	富士フイルム（株）CSR 推進部 環境・品質マネジメント部素材試験センター	委員	実験実施
23	牧 栄二	（財）食品農医薬品安全性評価センター	委員	実験実施

#:委員会でのバリデーション実施に関する審議以外に特に担当した分野

表2：バリデーションで用いられた被験物質

被験物質コード	物質名	感作性の有無と程度*	第1実験	第2実験
A	2,4-dinitrochlorobenzene	非常に強い	○	
B	hexylcinnamic aldehyde	中程度	○	○
C	3-aminophenol	中程度	○	
D	glutaraldehyde	非常に強い	○	
E	cobalt chloride	強い	○	○
F	isoeugenol	中程度	○	
G	formaldehyde	強い	○	
H	dimethyl isophthalate	無し	○	
I	isopropanol	無し	○	
J	nickel sulfate	無し**	○	○
K	abietic acid	弱い	○	
L	methyl salicylate	無し	○	
M	lactic acid	無し		○
N	potassium dichromate	強い		○

*: LLNA 法での評価結果に基づく判定

**：ヒトでは陽性と報告されている。

表 3 被験物質の安定性についてのまとめ

	被験物質	媒体 ¹⁾	容器	調製時 (配布前) の状態	投与時の状態	調製時 の状態 と投与 時の状 態の一 致	22 日間 の安定 性試験 データ ^{2, 3)}	安定性に 問題がな いと推定 し、別途 解析する 被験物質
第 1 実 験	A: 2, 4-dinitrochlorobenzene	A00	プラスチック製	溶解	溶解	一致	NT	○
	B: hexylcinnamic aldehyde	A00	プラスチック製	溶解	溶解	一致	安定	○
	C: 3-aminophenol	A00	プラスチック製	溶解	懸濁	不一致	安定	
	D: glutaraldehyde	ACE	プラスチック製	溶解	溶解	一致	NT	○
	E: cobalt chloride	DMSO	プラスチック製	溶解	2施設が懸濁、 1施設が溶解	不一致	NT	
	F: isoeugenol	A00	プラスチック製	溶解	溶解	一致	NT	○
	G: formaldehyde	ACE	プラスチック製	溶解	溶解	一致	NT	○
	H: dimethyl isophthalate	A00	プラスチック製	溶解	施設により差あり	不一致	NT	
	I: isopropanol	A00	プラスチック製	溶解	施設により差あり	不一致	NT	
	J: nickel sulfate	DMSO	プラスチック製	高濃度で 懸濁	2施設が懸濁、 1施設が溶解	不一致	NT	
	K: abietic acid	A00	プラスチック製	溶解、 ただし 3 回中 1 回 の調製に おいて高 濃度で懸 濁	懸濁	不一致	安定	
L: methyl salicylate	A00	プラスチック製	溶解	溶解	一致	NT	○	
第 2 実 験	B: hexylcinnamic aldehyde	A00	ガラス製	溶解	溶解	一致	安定	○
	E: cobalt chloride	DMSO	ガラス製	溶解	溶解	一致	NT	○
	J: nickel sulfate	DMSO	ガラス製	高濃度で 懸濁	全濃度で懸濁	一致	NT	
	M: lactic acid	DMSO	ガラス製	溶解	溶解	一致	NT	○
	N: potassium dichromate	DMSO	ガラス製	溶解	溶解	一致	NT	○

1) A00: acetone/olive oil, ACE: acetone, DMSO: dimethyl sulfoxide

2) NT: not tested

3) 本安定性データはバリデーション後に実施され、バリデーションと同一の容器、同一の保管条件の結果ではない

表 4-1 各施設での個々の物質の判定結果 (第 1 実験)

被験物質	感作性*		施設										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A: 2,4-dinitrochlorobenzene	+	Extreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B: hexylcinnamic aldehyde	+	Moderate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C: 3-aminophenol	+	Moderate	-		-						-		
D: glutaraldehyde	+	Extreme	+	+				-					
E: cobalt chloride	+	Strong				-		+			+		
F: isoeugenol	+	Moderate				+	+					+	
G: formaldehyde	+	Strong	+	+				-					
H: dimethyl isophthalate	-	Negative	-		-						-		
I: isopropanol	-	Negative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J: nickel sulfate	-	Negative				-		+			+		
K: abietic acid	+	Weak		+					+	+			
L: methyl salicylate	-	Negative			-						-		-

*:LLNA法の評価結果に基づく感作性の判定

表 4-2 各施設での個々の物質の判定結果 (第 2 実験)

被験物質	感作性*		施設							
			11	12	13	14	15	16	17	
B: hexylcinnamic aldehyde	+	Moderate	+	+	+	+	+	+	+	+
E: cobalt chloride	+	Strong	-		-	+				+
J: nickel sulfate	-	Negative	-	-		-			-	
M: lactic acid	-	Negative	-		-			-	-	
N: potassium dichromate	+	Strong	+	+				+		+

*:LLNA法の評価結果に基づく感作性の判定

表 4-3 代替可能性の指標 (第 1 実験の結果*)

	被験物質数	感度	特異度	陽性予測度	陰性予測度	正確性
LLNA-DA 法 vs LLNA 法	12	87.5% (7/8)	75.0% (3/4)	87.5% (7/8)	75.0% (3/4)	83.3% (10/12)

*:この被験物質について、施設毎の感作性評価について多数施設での判定結果をもとに計算

表 5-1 : LLNA-DA 法による皮膚感作性判定結果と他の試験法との比較

(申請者による自家試験結果)

chemicals	判 定 結 果			
	LLNA-DA	LLNA*	GMPT/BA*	HMT/HPTA*
2,4-dinitrochlorobenzene	+	+	+	ND
<i>p</i> -phenylenediamine	+	+	+	+
toluene 2,4-diisocyanate	+	+	ND	ND
glutaraldehyde	+	+	+	+
Potassium dichromate	+	+	+	+
phthalic anhydride	+	+	+	ND
trimellitic anhydride	+	+	ND	ND
formaldehyde	+	+	+	+
cinnamic aldehyde	+	+	+	+
isoeugenol	+	+	+	+
Cobalt chloride	+	+	+	+
eugenol	+	+	+	+
resorcinol	+	+	+	+
benzocaine	+	+/-	+	+
abietic acid	+	+	+	+
hexyl cinnamic aldehyde	+	+	+	ND
mercaptobenzethiazol	-	+	+	+
citral	+	+	+	+
hydroxycitronellal	+	+	+	+
imidazolidinyl urea	+	+	+	+
Sodium lauryl sulfate	+	+	-	-
NiSO ₄	-	-	+	+
benzalkonium chloride	+	-	-	+
propyl paraben	-	-	-	+/-
diethylphthalate	-	-	ND	ND
1-bromobutane	-	-	ND	ND
methylsalicylate	-	-	-	-
chlorobenzene	-	-	-	ND
lactic acid	-	-	-	ND
hexane	-	-	ND	-
isopropanol	-	-	-	ND

*: K. E. Haneke et al. Reg. Toxicol. Pharmacol. 274-286, 34, 2001.

GMPT: Guinea pig maximization test, BA: Buehler assay

HMT: Human miximization test, HPTA: Human patch test allergen

表5-2：LLNA-DA法による皮膚感作性判定結果と他の試験法との比較

(申請者による自家試験結果)

		LLNA 試験結果	
		+	-
LLNA-DA 試験 結果	+	2,4-dinitrochlorobenzene, p-phenylenediamine, toluene 2,4-diisocyanate, glutaraldehyde, K2Cr207, phthalic anhydride, trimellitic anhydride, formaldehyde, cinnamic aldehyde, isoeugenol, CoCl2, eugenol, resorcinol, abietic acid, hexylcinnamic aldehyde, citral, hydroxycitronellal, imidazolidinyl urea, Sodium lauryl sulfate	benzalkonium chloride
	-	mercaptobenzethiazol	NiSO4, propyl paraben, diethylphthalate, 1-bromobutane, methylsalicylate, chlorobenzene, lactic acid, hexane, isopropanol

+：感作性試験結果が陽性、-：感作性試験結果が陰性

	被験物質数*	感度	特異度	陽性予測度	陰性予測度	正確性
LLNA-DA 法 vs LLNA 法	30	95.0% (19/20)	90.0% (9/10)	95.0% (19/20)	90.0% (9/10)	93.3% (28/30)

*：LLNA-DAで+、LLNAで+/-となった benzocaine は計算に入れていない。

LLNA-DA 法バリデーション研究 報告書（概括）

Version 1.0

報告書作成日：2007年5月18日
報告書作成責任者：大森 崇

LLNA-DA 法バリデーション研究実行委員

委員長

大森 崇 (京都大学大学院医学研究科医療統計学分野)

委員

小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部)

寒水孝司 (大阪大学臨床工学融合研究教育センター)

吉村 功 (東京理科大学工学部経営工学科)

出原賢治 (ダイセル化学工業株式会社 評価・解析センター)

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部)

金澤由基子 (財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 医療用具試験室)

武吉正博 (財団法人 化学物質評価研究機構安全性 評価技術研究所
研究第一部)

小坂忠司 (財団法人 残留農薬研究所 毒性部)

浦谷 衛 (石原産業株式会社 中央研究所 安全科学研究室 安全性グループ)

山中 淳 (ピアス株式会社 中央研究所 ARI 評価グループ)

篠田伸介 (株式会社 薬物安全性試験センター埼玉研究所 第二毒性部)

中村洋介 (住友化学株式会社 情報電子化学業務室)

青儀 巧 (大塚製薬株式会社 徳島研究所 安全性研究センター 第2研究室)

米田知史 (トーアエイヨー株式会社 研究開発部 福島研究所)

花田智彦 (日本新薬株式会社 創薬研究所 安全性研究部)

猪田健人 (中野製薬株式会社 マーケティング本部研究)

田中正志 (明治製菓株式会社 医薬開発部門 動態安全性研究所)

有馬和範 (大正製薬株式会社 安全性研究所)

宇佐美雅仁 (ホーユー株式会社 総合研究所 基盤技術研究室)

篠田直樹 (参天製薬株式会社奈良研究開発センター)

湯浅敦子 (富士フイルム株式会社 CSR 推進部 環境・品質マネジメント部
素材試験センター)

牧 栄二 (財団法人食品農医薬品安全性評価センター)

目次

1	はじめに.....	4
2	2つの研究の要約.....	5
2.1	第1実験の要約.....	5
2.2	第2実験の要約.....	6
3.	2つの研究の評価外の LLNA-DA 法の特徴.....	7
3.1	試験法の頑健性.....	7
3.2	動物福祉面について.....	7
3.3	コストについて.....	7
3.4	SOP とプロトコールに関して.....	7
3.5	評価委員による評価結果への返答としてのまとめ.....	8
4.	総括.....	8

1 はじめに

本報告書は、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会により組織された LLNA-DA 法バリデーション研究実行委員会が実施したバリデーション研究の報告書である。

ダイセル化学工業（株）は、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）に評価を依頼するため LLNA-DA 法を新しい皮膚感作性試験の代替法として応募した。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判断し、日本動物実験代替法学会評価委員会に評価を依頼した。その結果、LLNA-DA 法には複数の施設で実施されたバリデーション研究が必要とされ、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会の支援により、バリデーション研究を実施することとなった。これが本報告書で報告するバリデーション研究である。

当初、動物実験代替法学会が参加施設を公募したところ、19 の実験実施施設がバリデーション研究の参加を希望した。しかしながら、一度にこれだけの施設に動物および測定器の供給を行うことが不可能であったために、実験実施施設としての参加施設を第 1 グループと第 2 グループに分け、2 つの研究を実施することとなった。グループ分けは、LLNA 法やそれに準じた試験法を実施した経験があることや日本動物実験代替法学会の評価委員会に委員が属すること等が基準とされた。これらの基準に該当した 10 施設が第 1 グループとして、先行する研究の実施施設となった。本研究では、第 1 グループにより実施された研究を第 1 実験と呼ぶことにする。この研究の結果は「LLNA-DA 法バリデーション研究（第 1 実験）報告書」としてまとめた。残りの 9 施設については第 2 グループとして、第 1 実験の結果が得られた後に第 1 実験で生じた課題を評価することとした。第 2 グループの実験は施設による実験期間の都合により実際に実験を実施した施設は 7 施設となった。第 2 グループにより実施された研究をここでは第 2 実験と呼ぶことにする。この研究の結果は「LLNA-DA 法バリデーション研究（第 2 実験）報告書」としてまとめた。

本概括では、2 つのバリデーション研究の要約、2 つのバリデーション研究の評価外の LLNA-DA 法の特徴および総合的な結論を記載することにする。

2 2つの研究の要約

第1実験、第2実験それぞれの研究の詳細は、別に記載する報告書を参照されたい。ここでは、個々の研究の要約を示す。

2.1 第1実験の要約

【目的】 Local Lymph Node Assay (LLNA 法) はマウスのリンパ節細胞増殖反応により皮膚感作性を評価する試験法であり、モルモットを用いた試験法である Guinea-Pig Maximization Test や Buehler Test (GPMT/BT 法) の代替法として広く知られている。LLNA-DA 法は³H-thymidine の取り込み量の代わりに ATP 量を用いる方法であり、ラジオアイソトープの管理に厳しい本邦でも容易に実施できるという利点がある。第1実験では、施設間再現性と代替可能性の検討を主目的とした LLNA-DA 法の多施設バリデーション研究を実施した。

【方法】実験は、このバリデーション研究用に作成された LLNA-DA 法の standard operating procedure (SOP) に従って実施した。実験を行う前に、提案施設が主導となり技術研修会を実施した。12 被験物質のうち、3 物質は全 10 施設で、残りの 9 物質は 3 施設ごとに評価した。各被験物質をコード化し、3 用量に調製して各実験施設に送付した。判定基準は溶媒対照群の ATP 発光量に対する被験物質群の ATP 発光量の比 (stimulation index, SI 値) が 3 を超えた場合に陽性と判定した。

【結果と考察】 全施設で評価した 3 被験物質及び 3 施設で評価したその他の 5 被験物質については、施設間のばらつきは小さく、すべての施設の判定が一致した。施設間で判定が一致しなかった 4 物質中 2 物質には明らかな用量反応関係がみられたが、残りの 2 物質 (cobalt chloride と nickel sulfate) はばらつきが大きかった。この原因にはこれら被験物質の溶媒や被験物質の物性が影響している可能性があるかと推察された。GPMT/BT 法に対する LLNA-DA 法の感度、特異度、一致割合はそれぞれ 87.5% (7/8), 100% (3/3), 90.9% (10/11) であり、この結果は同じ被験物質の文献値で算出した GPMT/MT 法に対する LLNA-DA 法の感度、特異度、一致割合と同程度であった。

【結論】 本バリデーション研究で実施した 12 の被験物質の濃度範囲で得られた結果は LLNA 法と同程度であり、キャッチアップバリデーション研究として受け入れられるものであると思われる。

2.2 第2実験の要約

【目的】LLNA法やそれに類した方法を実施した経験がある10施設で12被験物質を用いて実施したバリデーション研究（第1実験）では、Acetone/Olive Oil（AOO）とAceton（ACE）を溶媒とした10の被験物質で良好な結果が得られた。しかしdimethyl sulfoxide（DMSO）を溶媒とした2つの金属塩では施設間差が大きくその原因が不明であった。そこで第2実験では、1)試験法の実施のしやすさの判定方法の構築とその評価ならびに2)金属の適用の可能性と溶媒としてDMSOを用いる被験物質の追加検討を行う目的で、7実験実施施設によるLLNA-DA法のバリデーション研究を実施した。

【方法】実験は、第1実験と同様にこのバリデーション研究用に作成されたSOPに従って実施した。実験を行う前に、提案施設が主導となり技術研修会を実施した。その際、DMSOの塗布が新たに項目として追加された。5被験物質のうち、1物質は第1実験と共通の被験物質とし、全7施設で実験を実施し、残りの4物質は4施設ごとに評価した。この4物質は溶媒にDMSOを用いるものが選ばれ、そのうち3物質が金属塩であった。各被験物質をコード化し、3用量に調製して各実験施設に送付した。判定基準は、第1実験と同様にSI値が3を超えた場合に陽性と判定した。また、提案施設の背景データに基づく「一定の基準を満たす施設」の基準を構築した。

【結果と考察】 実験を実施した7施設すべてが「一定の基準を満たす施設」と判定された。全7実験実施施設で評価した1被験物質及び4実験実施施設で評価したその他の3被験物質については、施設間のばらつきは極めて小さく、すべての施設の判定が一致した。施設間で判定が一致しなかった1物質はどの施設でも高用量でSI値は3付近であり、用量反応関係がみられた。

【結論】 7実験実施施設による5被験物質の結果は、いずれも高い施設間再現性を示した。LLNA-DA法は金属塩にも使用可能であるが、溶媒としてDMSOを用いる場合は塗布操作に注意する必要がある。良好な施設間再現性は事前に技術研修を適切に行ったことが大きな要因のひとつであると考えられる。

3. 2つの研究の評価外の LLNA-DA 法の特徴

3.1 試験法の頑健性

本研究では、可能な限り条件をそろえて試験法の評価を試みた。このため動物種や ATP 発光量の測定器の違いを含めて研究で作成した SOP との違いがどの程度結果に影響するのかは明確ではない。

3.2 動物福祉面について

動物の福祉に関する側面に関して、LLNA-DA 法は LLNA 法と基本的には変わりはない。すなわち、この試験系はマウスを使った *in vivo* の試験法であり動物を使用しない方法ではない。しかしながら、皮膚感作性評価に関して、従来より実施されてきたモルモットの実験と比べて、これらの方法では要求される動物の使用数を減らすことができるという点では利点がある。また、LLNA-DA 法は 7 日目に塗布操作が入るため実験に要する日数は 8 日と LLNA 法と比べて 2、3 日が長くなるものの、これらの方法は感作誘導反応を評価しているため、感作誘発期の評価を行う GPMT 法 (24 日程度) や BT 法 (38 日程度) に比べて、実験に要する日数が短いという利点がある。また、GPMT 法ではモルモットの感受性を高めるために Adjuvant を用いるが、これは動物に対する負担が大きい。一方、LLNA-DA 法や LLNA 法では Adjuvant を用いないので、Refinement の観点から優れているといえるであろう。

3.3 コストについて

LLNA 法は Radioactive Isotope (RI) 施設で実施する必要があるが、³H で標識されたチミジンの DNA への取り込み量を測定するためにシンチレーションカウンタが必要である。これに対して、LLNA-DA 法は RI 施設で実施する必要がなく、ATP 発光量の測定器はシンチレーションカウンタに比べて相対的に安価である。

また、試薬の観点でも、LLNA-DA 法で用いる ATP 発光量の測定キットは比較的安価であり、測定も容易である。

3.4 SOP とプロトコールに関して

本研究で用いた SOP は、当初の提案施設が作成した LLNA-DA 法プロトコールを基に、バリデーション研究用に作成されたものである。本研究の SOP では、バリデーション研究用に設定された群の構成等に関する事項だけでなく、LLNA-DA 法の操作で重要な点である「細胞懸濁液の調製の実験手順」及び「ATP 量の測定」に関しても補遺として加筆した。提案施設の作成した LLNA-DA 法