

Mean absorbance and SI value (SI_sub_J.txt)

Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	SI	95%CI	
							lower	upper
J	1	Low	4	0.107	0.330	3.08	1.84	5.15
	1	Mid	4	0.107	0.471	4.40	2.92	6.62
	1	High	4	0.107	0.191	1.78	1.22	2.61
	5	Low	4	0.053	0.225	4.25	1.48	12.22
	5	Mid	4	0.053	0.088	1.67	0.75	3.72
	5	High	4	0.053	0.883	16.64	5.67	48.78
	6	Low	4	0.163	0.261	1.60	1.09	2.34
	6	Mid	4	0.163	0.293	1.80	1.30	2.49
	6	High	4	0.163	0.321	1.97	1.37	2.84

3.5 LLNA-BrdUの分析感度

本報告書では、分析感度を陽性対照物質が適切に陽性と判定される能力と定義した。図4に示す各実験の陽性対照物質のSI値とその95%信頼区間を示す。

施設2の第1期でSI値が2未満となった。このため、この施設2の第1期の被験物質群（物質Bおよび物質H）のデータは不採用とし、以後の解析に含めていない。

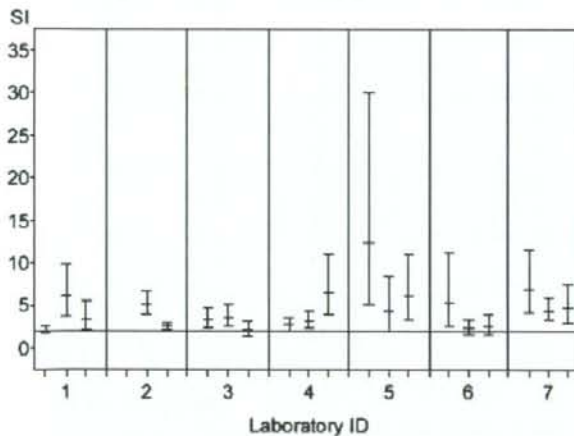
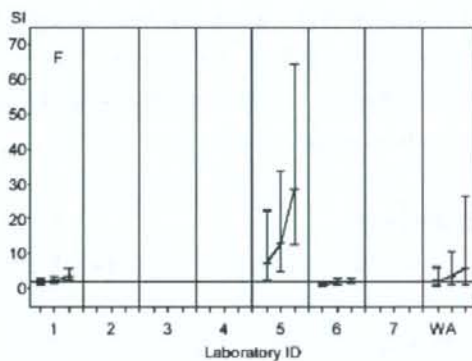
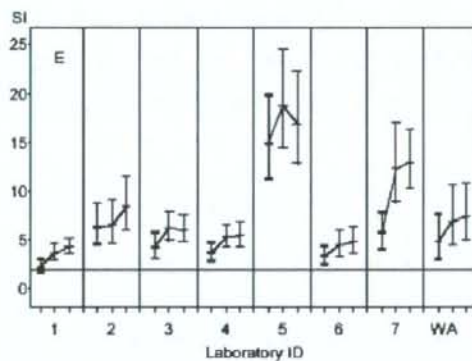
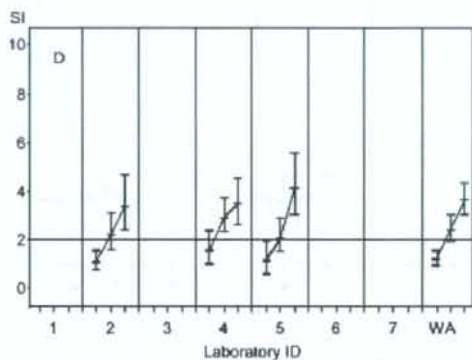
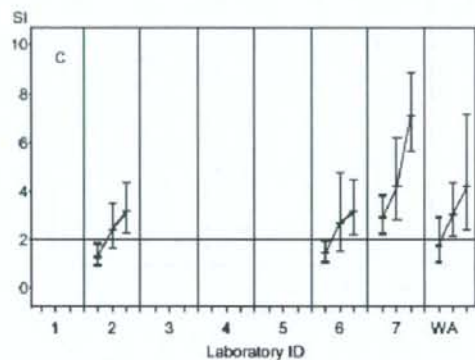
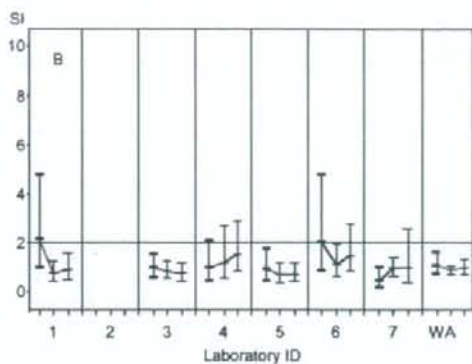
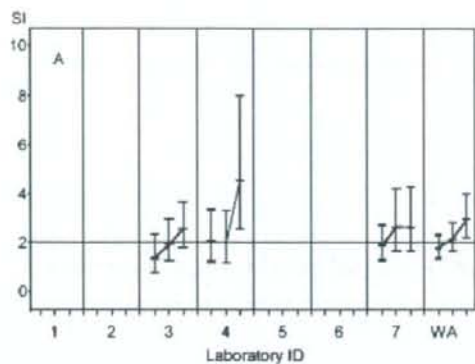


図4. 第2次バリ実験のSI値

3.6 各被験物質の用量反応関係

図5にSI値の用量反応関係を示す。図中WAと示されているのは、変量効果モデルを用いたメタ・アナリシスにより得られたSI値の重み付き平均を示している。



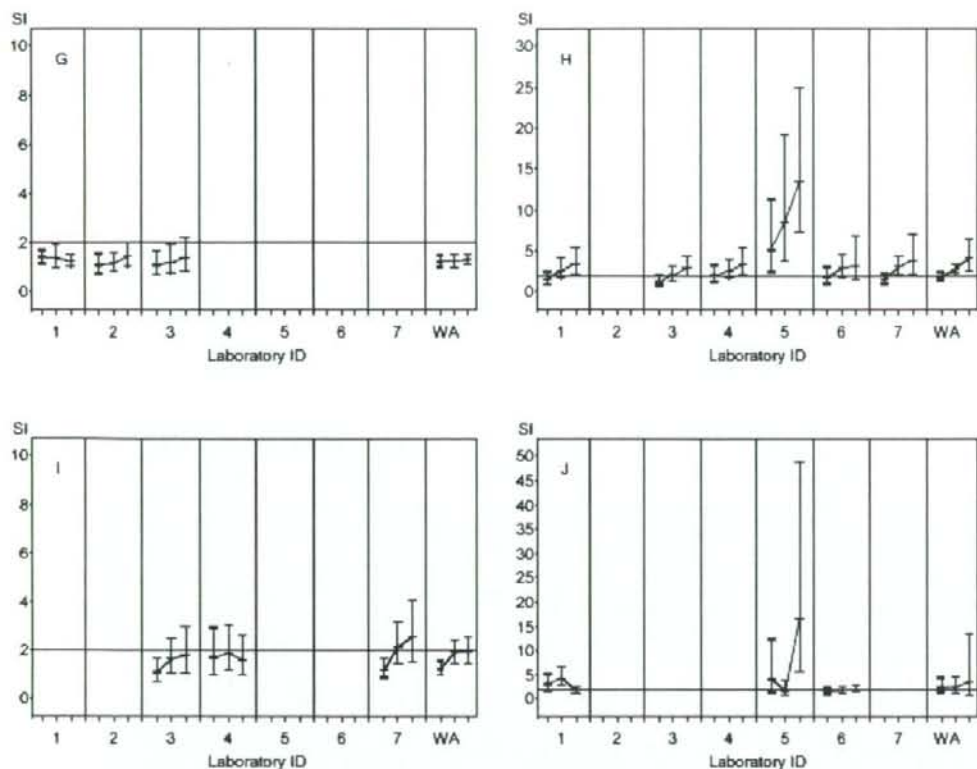


図5. 物質毎に各施設のSI値

3.7 施設内再現性

図4から陽性対照物質に関する各施設内の再現性を把握できる。図中に示された信頼区間を考慮すると、SI値のばらつきはそれほど大きくはないため、施設内再現性は良好であると判断した。また、この陽性対照物質はHCAの50%濃度であり、これは物質Hの最高濃度と同じものである（図5）。図4と図5（Hの最高濃度）に示されるSI値からも施設内の再現性は高いといえる。

3.8 施設間再現性

表13にSI値が濃度依存的に正の傾きでSI値が2を超えるものを陽性、そうでないものを陰性と判定した場合の結果を示した。施設間で判定の結果が食い違うのは物質I：lactic acidと物質J：formaldehydeであるが、図5からは施設間差は大きくないと考える。図5からは、LLNAで陰性と判定されている物質B：isopropanol、物質G：methyl salicylate、物質I：lactic acidの施設間再現性は極めて高い。物質E：2,4-dinitrochlorobenzene、物質F：glutaraldehyde、物質H：hexylcinnamic aldehyde、物質J：formaldehydeの施設5のSI値が他の施設に比べて、高い値を取っていた。施設5と7は陽性対照物質でも他の施設に比べ、高いSI値を報告している。これらの結果と信頼区間の幅を考慮すると、施設間差は受け入れられると考える。

I：lactic acidにおいて施設7が、J：formaldehydeにおいて施設6が他の施設と異なった判定結果を示した。I：lactic acidは図5に示されるように、SI値の施設感差は大きくない。J：formaldehydeの施設7は、高濃度でのSI値は大きい用量依存性が明確ではない。溶媒対照の吸光度が低く、被験物質の吸光度が高めの値を示したことが高濃度で高いSI値を示した原因のようである。

表13. 陽性・陰性の判定結果

Code	Substance name	LLNA classification	Lab No.						
			1	2	3	4	5	6	7
A	Nickel sulfate	False Negative			P	P			P
B	Isopropanol	Negative	N		N	N	N	N	N
C	Eugenol	Weak		P				P	P
D	Cinnamic aldehyde	Moderate		P		P	P		
E	2, 4-Dinitrochlorobenzene	Extreme	P	P	P	P	P	P	P
F	Glutaraldehyde	Extreme	P				P	P	
G	Methyl salicylate	Negative	N	N	N				
H	Hexylcinnamic aldehyde	Moderate	P		P	P	P	P	P
I	Lactic acid	Negative			N	N			P
J	Formaldehyde	Strong	P				P	N	

P:陽性, N:陰性

3.9 代替可能性

対象となる試験法であるGPMT/BT法, LLNA法の感作性の判定結果は, Hanekeら(2001)とGerberickら(2004)の文献の値を用いた。

図5に示される重み付平均に基づき, 代替可能性を検討した結果を表14, 表15に示す。LLNA-BrdU法とGPMT/BT法の比較では, 食い違いはなく(表14), LLNA-BrdU法とLLNA法の比較ではLLNA法では偽陰性を示すと報告されているA: nickel sulfateが食い違う結果となった(表15)。判定の食い違った物質A: nickel sulfateは, LLNA-BrdU法では3施設すべてで陽性と判定されており, いずれの施設の結果も用量反応関係は明確であった。表16には以上の結果を指標の一覧としてまとめた。いずれの指標でも代替可能性は高かった。

表14. LLNA-BrdU法とGPMT/BA法の比較表

		LLNA-BrdU法		合計
		+	-	
GPMT/BT法	+	7	0	7
	-	0	3	3
合計		7	3	10

表15. LLNA-BrdU法とLLNA法

		LLNA-BrdU法		合計
		+	-	
LLNA法	+	6	0	6
	-	1	3	4
合計		7	3	10

表16. 代替可能性の指標

	n	感度	特異度	一致度	陽性予測度	陰性予測度
LLNA-BrdU法 vs GPMT/BT法	10	100%	100%	100%	100%	100%
		(7/7)	(3/3)	(10/10)	(7/7)	(3/3)
LLNA-BrdU法 vs LLNA法	10	100%	75%	90%	87.5%	100%
		(6/6)	(3/4)	(9/10)	(6/7)	(3/3)

4. 考察

4.1 本研究の位置付け

OECD (2005) のガイドライン文書34 の用語集には、キャッチアップバリデーション研究とは“A validation study for a test method that is structurally and functionally similar to a previously validated reference test method. The candidate test method should incorporate the essential test method components included in performance standards developed for the reference test method and should have comparable performance when evaluated using the reference chemicals provided in the performance standards” であると記載されている。

LLNA-BrdU法はLLNA法におけるエンドポイントの改良法であり、両試験法の原理は同じである。そして、本研究に用いた被験物質は、LLNA法の性能を評価するために実施された被験物質を用いた。したがって、本バリデーション研究は、上記のキャッチアップバリデーション研究に該当すると考えた。

4.2 本研究の妥当性

4.2.1 本研究で評価したLLNA-BrdU法の特徴

本研究で評価した試験法であるLLNA-BrdU法はの原理はLLNA法と同じである。LLNA-BrdU法の特徴は、エンドポイントをBrdUの取り込み量としてキットを用いて吸光度の測定としている。吸光度の測定操作は極めて簡便であり、測定結果は迅速に得られる。

また、LLNA-BrdU法の実験そのものはLLNA法に近く、被験物質の投与に関する変更は行われていない。

4.2.2 被験物質の選択

本研究では、既知のデータが豊富でLLNA法での実験結果がわかっている20の被験物質のリスト(資料4)の中から10被験物質を選択した。LLNA法による文献のEC3値に基づき感作性を3段階[無(negative)、弱(weak, moderate)、強(strong, extreme)]に分類した場合、10被験物質の感作性の内訳は、無が3物質、弱が3物質、強が4物質であり、試験物質の選択は妥当と考えた。第1次バリ実験では、ブラインドされた被験物質を配布者が事前に調製して送付したが、第2次バリ実験では秤量したものを送付した。変更の理由として、被験物質の安定性確保、第1次バリ実験で被験物質の析出が認められた物質について各実験施設で改めて調製できなかったという短所を解決するためである。用事調製に変更したことより、実験者による状態確認と溶液もしくは均一な懸濁液の調製が可能になった。ただし、以前から長所と言われていた以下の要件も満たされた。①各被験物質の同一濃度での結果を比較する、③適用濃度から感作性の強度を予測できないようにする、④溶媒の選択。また、LLNA-DA法バリデーション研究において溶媒でプラスチック容器が溶けたとの反省をもとに、すべての被験物質溶液はガラス瓶に入れたものが配布された。

4.2.3 試験法の普及

施設間差を少なくするために、本研究ではデータシートを作成してデータの入力フォーマットを統一した。第1次バリ実験の経験を経て、第2次バリ実験の結果を採用したので十分な経験を持つ施設での実験になったと考えられる。

4.2.4 データの質に関して

実施可能性の面から、本研究では、完全なGLP (Good laboratory practice) に対応した実験を実施できなかった。しかしながら、データの質を担保するために以下に記載するような配慮をした。

実験についての記録用紙(資料7)を作成した。記録用紙には実験担当者・実験責任者のもとで、機器の校正・作動確認、使用液・試薬の使用について、動物への適用、実験時間が記録され、各施設に残されている。これらの記録は試料等手配担当者およびデータ解析担当者ですべて確認作業が行われ、不備については聞き取り調査を実施し、すべての内容を確認した。

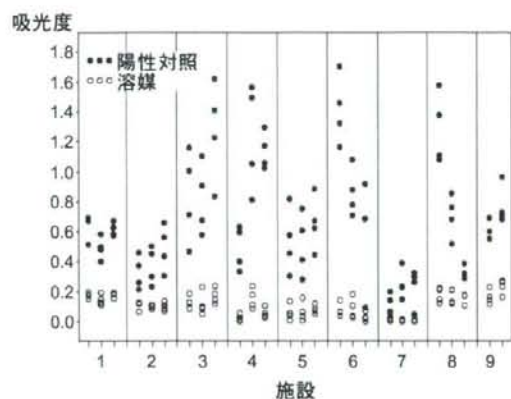
測定値がこの研究のために準備された一定の書式のデータシート(資料8)に正しく記録されているかどうかを確認するために、データクリーニングが行われ、実験中にデータシートのプリントアウトに入力されたデータと入力されたファイルとの値の整合性が確認された。なお、このデータシートは入力規制機能を用いて、不適切な値が入らないように設計された。なお、各施設から集められたデータシートの電子ファイルは、プログラムにより一括して読み込まれ、データベースが作成されている。

4.2.5 本研究の判定基準の変更について

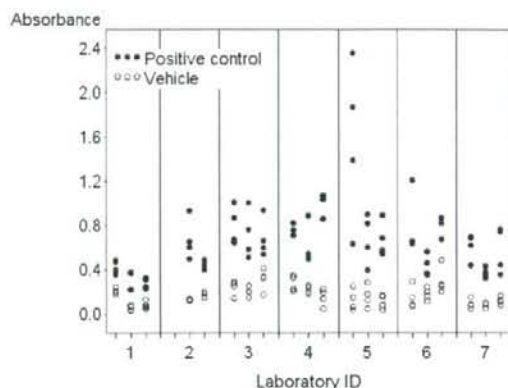
本研究で用いた SOP では、各試験施設において実施された予備実験の結果に基づき、陰性対照ウエルの吸光度が 0.1~0.2 となる細胞浮遊液を調製し実験した。そして、溶媒の BrdU 取り込み量の吸光度の平均値が 0.1~0.2 の範囲に含まれない場合には細胞浮遊液の冷蔵保存液を翌日以降希釈し、再測定するとなっていた。

しかし、希釈をしたとしても溶媒の BrdU 取り込み量の吸光度の平均値を 0.1~0.2 の範囲内に納めることは難しく、実際にこの基準を満たせない実験が多かった。この検討を実施した施設が第1次バリ実験の経験を経た施設であった点を考慮すると、この基準は厳しすぎると考えられる。また、この希釈による再測定が LLNA-BrdU 法の特徴であるが、再測定の結果としてバラツキが大きくなることが懸念された。このため、実行委は、当初設定した基準を採用するのは適切ではないと判断した。そこで、本報告では、希釈前の1回目の吸光度を用い、再測定のデータは用いないという方針に変更した。

この変更が適切かどうかについて、陽性対照物質を用いた結果で第1バリ実験(小島ら, 2007)と比較した。図6は陽性対象物質の溶媒および陽性対照物質の BrdU 取り込み量の吸光度を、図7はそこから計算される SI 値とその95%信頼区間を第1次バリ実験と第2次バリ実験と比較したものである(縦軸のスケールが異なるので注意)。図6(a)から、第1次バリ実験では溶媒の吸光度が施設毎で大きく異なっているのがわかる。特に、第1実験の施設7のように溶媒の吸光度の平均値が0に近くなると、相対的に SI 値が大きくなってしまふ(図7(a))。溶媒の BrdU 取り込み量の吸光度の平均値を 0.1~0.2 の範囲に納めることを目指して実施された第2次バリ実験では、結果的に溶媒における BrdU 取り込み量の吸光度の平均値は 0.05~0.32 の間であった。この場合、図7の(b)からわかるように、SI 値が極端に大きくなる傾向はみられない。よって、溶媒における BrdU 取り込み量の吸光度をある程度の範囲に管理することで、安定した結果が得られると考えられる。

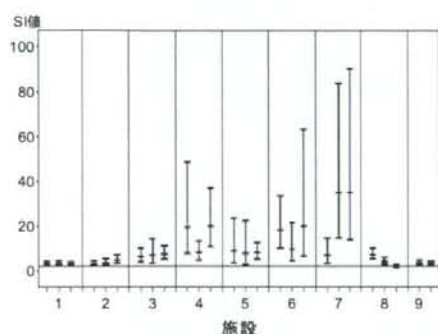


(a) 第1次バリ実験

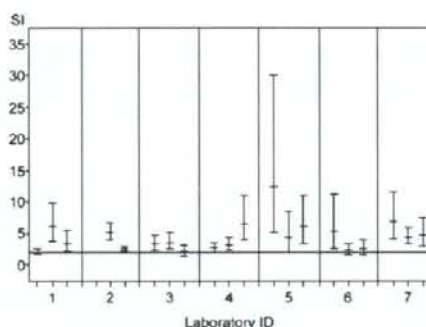


(b) 第2次バリ実験

図6. 第1次バリ実験および第2次バリ実験における陽性対照物質のBrdU取り込み量（吸光度の分布）



(a) 第1次バリ実験



(b) 第2次バリ実験

図7. 第1次バリ実験および第2次バリ実験における陽性対照物質のSI値

SOP では、最終容量 15mL の細胞浮遊液を作成する例が記載されており、複数の施設でこの例に従って実験が行われていた。実験間のばらつきを小さくするために、細胞浮遊液の作成方法は統一した方がよいと考える。この試験法を実施するには、最終容量 15mL 前後で事前に至適条件を検討し、吸光度が 0.1~0.2 に入るようにリンパ節の細胞浮遊液の作製条件を定めることが望ましいと考える。

以上の観点から、現時点における LLNA-BrdU 第2バリ実行委の推奨する実験条件は以下のとおりである。

- (1) 事前に溶媒の BrdU 取込み量の平均吸光度を 0.1~0.2 前後にするための至適条件を検討し、細胞浮遊液の最終容量を決める。
- (2) 細胞浮遊液の希釈は行わない。
- (3) 陽性対照物質 HCA50%濃度における SI 値が 2 以上を結果の採用する。

ただし、実験結果を解釈する際、溶媒の平均吸光度があまりに小さい場合には、SI 値が極端に大きくなる場合があることに注意する。

なお、誤解がないように注記しておくが、最終的に推奨する SOP に記載した実験の成立基準に関しては、データ解析上緩和した基準であり、エンドポイントである BrdU の取込み量や陽性の判断基準を変更しているわけではない。エンドポイントと判定基準は研究の計画に規定された事項に基づき解析を実施している。

4.3 個々の被験物質に対する考察

LLNA法やLLNA-DA法のSI基準値が3であるのに対し、本方法のSI値は2であるように、試験法の感度は低い、さらに、LLNA-BrdU法の陽性対照物質HCAの濃度が50%であり、LLNA-DA法では25%で同様の結果が得られる(大森ら, 2007)。しかしながら、表16に示すように、この研究で用いた多くの物質で、判定結果はLLNA法、GPMT/BT法の結果と一致した。また、LLNA法では偽陰性であるA: nickel sulfateがこの研究では、3施設すべてで陽性となっている。

個々の施設の結果ですと比較すると、F: glutalaldehyde, J: formaldehydeの用量反応曲線が施設によってばらついていて、F: glutalaldehydeでは1施設が他の施設と異なった判定結果を示した。J: Formaldehydeも施設6の結果は、SI2をわずかに下回った程度であり、施設間で大きな差があったとは言い難いと考えられた。これらの結果から、aldehydeの反応は評価が難しいと考えられた。ECVAMのperformance standard (Basketter, 2008) の中にも、第2次バリ実験で用いた10物質のうち、この2点のみが含まれておらず、バリレーションには使い難い物質の範疇に入るのかもしれない。

4.4 評価委員会からの提言とその対応

LLNA-BrdUのバリレーション研究の実施を促す評価委員会から、以下の提言を事前に受けた。

- 1) 評価委員の質問への回答に沿ってプロトコルや判定基準が適正な変更を条件に、多施設バリレ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、バリレ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レーションで良いと思われる。
- 3) Core laboratory は化学物質評価研究機構に務めてもらい、プロトコルを作成してもらい、また、技術トランスファーを実施してもらう。
- 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) バリレ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レ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。

本バリレーション研究の実施には、この提言を真摯に受け止め、概ね満たしていると考えている。最終的な推奨プロトコルでは、データ採用基準の変更はあるものの、LLNA-BrdU法の実験そのものはLLNA法に近いので、LLNA変法として受け入れやすいと考える。

5. 結論

本研究で実施した10の被験物質の濃度範囲で得られた結果は、施設内および施設間の再現性がよく、GPMT/BA法およびLLNA法に対する代替可能性も高く、これら試験法との同等性が確認された。LLNA-BrdU法の実験そのものはLLNA法に近いので、LLNA変法として受け入れやすいと考える。

謝辞

本研究は厚生労働科学研究「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」班、日本動物実験代替法学会の協力を得ました。本研究に対する理解と支援に感謝いたします。

本研究は、多くの方の協力を得ました。彼らの協力なしでは本研究を行えませんでした。以下の方々に心より感謝致します。

上森健至（ダイセル化学工業株式会社）、山岸学（ダイセル化学工業株式会社）、三輪麻紀子（国立医薬品食品衛生研究所）、古谷真美（財団法人食品薬品安全センター）、森村智美（財団法人食品薬品安全センター）、志田勝彦（財団法人食品薬品安全センター）、後藤浩彦（大塚製薬株式会社）、織原由佳里（大正製薬株式会社）、山崎紀世（大正製薬株式会社）、小宮千春（富士フイルム株式会社）、吉野幸江（富士フイルム株式会社）、藤島敦（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）、竹原広（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）

参考文献

- Basketter, D. A., Scholes, E. W., Kimber, I., Botham, P. A., Hilton, J., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C. and Waite, S. J. (1991) Interlaboratory evaluation of the local lymph node assay with 25 chemicals and comparison with guinea pig test data. *Toxicology Methods* 1, 30-43.
- Basketter, D. A. and Scholes, E. W. (1992) Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. *Food and Chemical Toxicology* 30, 65-69.
- Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I. and Loveless, S. E. (1996) The local lymph node assay: a viable alternative to currently accepted skin sensitization tests. *Food and Chemical Toxicology* 34, 985-997.
- Basketter, D. A., Gerberick, G. F. and Kimber, I. (1998) Strategies for identifying false positive responses in predictive skin sensitization tests. *Food and Chemical Toxicology* 36, 327-333.
- Basketter, D. A., Lea, L. J., Cooper, K. J., Ryan, C. A., Gerberick, G. F., Dearman, R. J. and Kimber, I. (1999) Identification of metal allergens in the local lymph node assay. *American Journal of Contact Dermatitis* 10, 207-212.
- Basketter, D. A., Lea, L. J., Dickens, A., Briggs, D., Pate, I., Dearman R. J. and Kimber I. (1999) A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. *Journal of Applied Toxicology* 19, 261-266.
- Basketter, D. A., Blaikie, L., Dearman, R. J., Kimber, I., Ryan, C. A., Gerberick, G. F., Harvey P., Evans, P., White, I. R. and Rycroft, R. J. G. (2000) Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* 42, 344-348.
- Basketter, D. A., Evans, P., Fielder, R. J., Gerberick, G. F., Dearman, R. J. and Kimber, I. (2002) Local lymph node assay - validation, conduct and use in practice. *Food and Chemical Toxicology* 40,

- Basketter, D. A., Casati, S., Gerberick, G. F., Griem P., Philips B. and Worth A. (2005) Skin sensitisation. *Alternatives To Laboratory Animals* 33 supplement 1, 83-103.
- Basketter, D. A., Cockshott, A. C., Corsini, E., Gerberick, G. F., Idehara, K., Kimber, I., Loveren, H. V., Matheson, J., Methling A., Omori T., Rovida, C., Sozu T., Takeyoshi, M. and Casati S. (2008) An evaluation of performance standards and non-radioactive endpoints for the local lymph node assay. *Alternatives To Laboratory Animals*, 36, 243-57.
- Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Hattan, D. G. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 34, 258-273.
- Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kimber, I., Dearman, R. J. and Basketter DA. (2000) Local lymph node assay: Validation assessment for regulatory purposes. *Toxicology* 11, 3-18.
- Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kern, P. S., Dearman, R. J., Kimber, I., Patlewicz, G. Y. and Basketter, DA. (2004) A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis* 50, 274-288.
- Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 34, 274-286.
- Kimber, I., Hilton, J., Botham, P. A., Basketter, DA., Scholes, E. W., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C., Gray, T. J. B. and Waite, S. J. (1991) The murine local lymph node assay: results of an inter-laboratory trial. *Toxicology Letters* 55, 203-213.
- Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Basketter, DA., Scholes, E. W., Ladics, G. S., Loveless, S. E., House, R. V. and Guy A. (1995) An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. *Toxicology* 103, 63-73.
- Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick G. F., Ryan, C. A., Basketter, DA., Lea, L., House, R. V., Ladics, G. S., Loveless, S. E. and Hastings K. L. (1998) Assessment of the skin sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: an interlaboratory evaluation. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 53, 563-579.
- Loveless, S. E., Ladics, G. S., Gerberick G. F., Ryan, C. A., Basketter, DA., Scholes, E. W., House, R. V., Hilton, J., Dearman, R. J. and Kimber, I. (1996) Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial. *Toxicology* 108, 141-152.
- Normand, S. L. T. (1999) Meta-analysis: formulating, evaluating, combining, and reporting. *Statistics in Medicine* 18, 321-359.
- OECD (1992) Organization for Economic Co-operation and Development - OECD guidelines for testing of chemicals. No. 406: Skin sensitization.
- OECD (2002) Organization for Economic Co-operation and Development - OECD guidelines for testing of chemicals. No. 429: Skin sensitization: Local lymph node assay.
- OECD (2005) Organization for Economic Co-operation and Development - OECD series on testing and assessment. No. 34: Guidance document on the validation and international acceptance of new or

updated test methods for hazard assessment.

- Saïstad, D. M., Hattan, D., Hill, R. N. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. I. the ICCVAM review process. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 34, 249-257.
- Scholes, E. W., Basketter, D. A., Sarll, A. E., Kimber, I., Evans, C. D., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C. and Waite, S. J. (1992) The local lymph node assay: Results of a final inter-laboratory validation under field conditions. *Journal of Applied Toxicology* 12, 217-222.
- 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
- 小島 肇ら (2007) LLNA-BrdU 法バリデーション研究 (第1実験) 報告書
- 大森 崇ら (2007) LLNA-DA 法バリデーション研究報告書

LLNA-BrdU 法バリデーション研究 (第 1 実験)

報告書

報告書作成日：2007 年12月24 日

改定日：2009年1月17日

報告書作成責任者：小島 肇

LLNA-BrdU 法バリデーション研究実行委員

委員長

小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部)

委員

大森 崇 (京都大学大学院医学研究科医療統計学分野)

寒水孝司 (大阪大学臨床医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)

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)

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)

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)

略号の原語または意味

ACD: Allergic Contact Dermatitis

AOO :Acetone/Olive Oil

BrdU: BromodeoxiUridine

BT :Buehler Test

EC3: The estimated concentration that yields a stimulation index of three

FCA: Freund' s Complete Adjuvant

GLP: Good Laboratory Practice

GPMT: Guinea-Pig Maximization Test

HCA: Hexyl Cinnamic Aldehyde

ICCVAM : Interagency Coordinating Committee on the Validity of Alternative Methods

LLNA: Local Lymph Node Assay

OECD: Organization for Economic Cooperation and Development

PBS: Phosphate Buffered Saline

RI: Radioactive Isotope

SI: Stimulation Index

SOP: Standard Operating Procedure

目次	
はじめに	5
要約	5
1. 背景	6
1.1 皮膚感作性	6
1.2 モルモットを用いた試験法	6
1.3 LLNA 法	6
1.4 LLNA-BrdU 法	6
1.5 本研究にいたるまでの過程	6
1.6 本研究の目的	7
2. 方法	7
2.1 組織と役割	7
2.1.1 研究の組織	
2.1.2 各組織の役割	
2.2 LLNA-BrdU の操作法	8
2.3 操作法の普及	9
2.3.1 技術研修会	
2.3.1 予備試験	
2.4 被験物質	9
2.4.1 割付	
2.4.2 試料等の配布	
2.5 実験実施のスケジュール	11
2.6 データの管理	12
2.7 データベース	12
2.8 データ解析の方法	12
2.8.1 体重, リンパ節重量, ATP 発光量	
2.8.2 SI 値とその95%信頼区間の算出	
2.8.3 施設内再現性, 施設間再現性を評価する方法	
2.8.4 代替可能性の検討の方法	
2.8.5 EC3 の算出方法と刺激のカテゴリ	
2.8.6 ソフトウエア	
3. 結果	13
3.1 研究の質について	13
3.2 選択された被験物質と割付け結果	13
3.3 データの取り扱いについて	14
3.4 背景基礎データ	15
3.4.1 体重	
3.4.2 BrdU取り込み (吸光度)	
3.4.3 リンパ節重量とBrdU取り込み量の関係	
3.5 LLNA-BrdU の分析感度	17

3.6 各被験物質の用量反応関係.....	18
3.7 施設間の再現性.....	19
3.8 施設内の再現性.....	19
3.9 代替可能性.....	20
4. 考察.....	19
4.1 本研究の位置付け.....	19
4.2 本研究の妥当性.....	20
4.2.1 本研究で評価したLLNA-BrdU 法の特徴	
4.2.2 被験物質の選択	
4.2.3 試験法の普及	
4.2.4 データの質に関して	
4.2.5 個々の被験物質に対する考察	
4.3 本研究の限界と今後の課題.....	21
5. 結論.....	22
謝辞.....	22
参考文献.....	22

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-BrdU 法バリデーション研究実行委員会(以後、LLNA-BrdUバリ実行委と記す)が実施したバリデーション研究報告書である。

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(GPMT/BT法)の代替法として広く知られている。LLNA-BrdU 法は³H-thymidine の取り込み量の代わりにBrdU量を指標として判定する方法であり、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。本研究では、LLNA-BrdU 法の施設間再現性と代替可能性の検討を主目的とし、LLNA法バリデーションを参考に、多施設キャッチアップバリデーション研究を実施した。

【方法】 本研究はLLNA-BrdU法の実験プロトコールに基づいて実施した。陽性対照物質(50% hexyl cinnamic aldehyde : HCA)以外の12の被験物質のうち、3物質は全9施設で、残りの9物質は3施設毎に評価した。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。溶媒対照群のBrdUと取り込み量対する被験物質群のBrdU取り込み量の比(stimulation index, SI値)が2を超えた場合、陽性と判定した。

【結果と考察】 全施設で評価した陽性対照物質HCAのSI値はバラツキが大きく、実験に用いたすべての被験物質の結果は評価できないと判断された。よって、実行委員会における検討の結果、試験手順書の改良が必要であると考察された。

【結論】 本研究で実施した得られた結果から、LLNA-BrdU法はLLNA法と比較してバラツキが大きく、試験法の改良が必要であると結論された。

1. 背景および目的

1.1 皮膚感作性

アレルギー性接触皮膚炎 (ACD: Allergic Contact Dermatitis) は、外部からの化学物質等 (抗原) が繰り返し接触し皮膚から吸収され、感作されたTリンパ球による反応であるIV型アレルギーにより接触部位に一致して炎症反応をきたした現象をいう。ACDは医薬品、産業で 사용되는化学物質や消費者に使用される製品までのさまざまな化学物質と関連があることが知られている。このため、化学物質の感作性を評価することは、安全性評価において重要である。

1.2 モルモットを用いた試験法

動物を用いた皮膚感作性試験としては、長い間モルモットを用いた試験であるGuinea-pig maximization test法 (GPMT法) やBuehler test法 (BT法) が利用されてきた (OECD, 1992)。これらの試験法では、感作誘導を行い、一定期間後の惹起処置による皮膚反応を観察することによって感作性を評価する。評価方法は、肉眼判定によるため主観が入る可能性があると言われている。

GPMT法では、感度を高めるために通常 Freund's Complete Adjuvant (FCA) を被験物質と乳化して皮内投与により感作誘導を行うが、BT法ではFCAを用いず、皮膚への繰り返し塗布により感作誘導を行う点がこれらの相違点である。

1.3 LLNA法

近年、マウスを用いた感作評価方法としてLLNA法 (Local Lymph Node Assay) が開発され、現在までに多くの研究成果が広く報告されている (Basketter and Scholes, 1992, Basketterら, 2002, Hanekeら, 2001)。

また、この方法はOrganization for Economic Cooperation and Development (OECD) の安全性試験ガイドライン429としても承認されているだけでなく (OECD, 2002)、Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) のImmunotoxicology Working Groupによるプロトコールとしても推奨されている (ICCVAM, 2001)。

十分な性能をもつin vitroの試験系が研究の段階であり実用化に至っていない現時点では、LLNA法はモルモットを使った試験系に比べて動物愛護の面でも優れているとされている (OECD, 2002)。

しかし、LLNA法は感作誘導期のリンパ節細胞増殖反応を ^3H で標識されたチミジン (^3H -thymidine) のDNAへの取り込みを指標として皮膚感作性を評価する。我が国ではRI (Radioactive Isotope) の取り扱い規制が厳しく、LLNA法の普及は十分ではない。

1.4 LLNA-BrdU法

化学物質評価機構 (以後、化評研) は、リンパ細胞増殖を検出する指標として ^3H -thymidineの代わりにBrdU (BromodeoxyUridine) 取り込み量に改良したLLNA-BrdU法を開発した (Takeyoshiら, 2000)。

1.5 本研究にいたるまでの過程

化評研は、動物実験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-BrdU法を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、かつ時間のかからず、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-BrdU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がLLNA-BrdU法バリデーション研究実行委員会（以下、LLNA-BrdUバリ実行委）を組織させ、この実行委員会が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。

なお、研究遂行においては、大野泰雄が主任研究者を務める厚生労働科学研究「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」班の協力を得た。

1.6 本研究の目的

本研究の研究計画には、以下の目的を含むLLNA-BrdU法研究計画書（資料1）に従い実施された。本研究の目的は、LLNA-BrdU法を被験物質遮蔽下で実施したときに、

- 1) 複数の施設間でどの程度一致するか（施設間再現性）、
 - 2) 過去にLLNA法で得られた判定結果とどの程度一致するか（代替可能性）
- を、多施設での実験を通して評価することである。

なお、2)の目的に対しては、GPMT/BT法に対するLLNA-BrdU法の代替可能性が、GPMT/BT法に対するLLNA法の代替可能性とどの程度一致するののかについて検討することを含めた。

2. 方法

2.1 組織と役割

2.1.1 研究の組織

本研究を遂行するための研究組織、LLNA-BrdU法バリデーション研究実行委員会（以下、LLNA-BrdUバリ実行委）は次の委員で構成された。

1) 実験施設代表者

日本動物実験代替法学会バリデーション委員会が募集したバリデーション研究に参加の意志を示した実験施設の代表者。実験施設から各1名。

2) バリデーション委員会委員

日本動物実験代替法学会バリデーション委員会に属する数名。

3) 各実験実施施設の代表者として必要な委員

各実験実施施設から数名。

当初、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会がLLNA-DA法バリデーション研究の参加施設を公募したところ、19の実験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、日本動物実験代替法学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10施設がこの研究の実験を実施する施設となった。このうち、施設の都合により9施設の代表者がLLNA-BrdUバリ実行委として本研究に参加した。

LLNA-BrdUバリ実行委を資料2「LLNA-BrdUバリ実行委」に、実験参加施設とその実験担当者を資料3「実験担当者一覧」に示す。

2.1.2 各組織の役割

LLNA-BrdUバリ実行委の中にいくつかの担当を設けた。担当とその役割は以下のとおりである。
実行委員長：研究組織と運営・進行を計画通りに行い、最終報告を作成する。

技術研修担当者：技術研修の準備を行い、LLNA-BrdU法の内容、standard operating procedure (SOP)、記録用紙等の説明を行い、実技指導を行う。

被験物質選定担当者：資料4「被験物質候補リスト」より、研究に用いる物質を選定する。

被験物質割付担当者：選定された被験物質を各施設に割り付けるための割付デザインを作成して試料等手配担当者に知らせ、研究結果が確定・公表されるまで割付の根拠を保管する。

動物手配担当者：実験用動物の注文・搬入の手配を行う。

試料等手配担当者：割付デザインとSOPに従って試料を調製し、コード化して実験参加施設に、関連する資材と共に送付する。研究結果が確定・公表されるまで、割付表とコード表を保管する。

実験参加施設代表者：本実行委に所属し、実験参加施設を代表する。

実験担当者：技術研修を受け、試料・機器手配担当者から送付された試料等を用いて、SOPに従った実験を行い、実験結果をデータ解析担当者に送付する。

実験責任者：施設で実施された実験について責任を持つ。

データ解析担当者：必要なデータクリーニングを行い、データベースを固定し、データ解析を行う。中間報告会では、解析結果をまとめて報告する。

2.2 LLNA-BrdUの操作法

資料1「LLNA-BrdU法研究計画」にもとづいて、この研究用にLLNA-BrdUバリ実行委がSOPを作成した。このSOPの最終版は資料5「LLNA-BrdU法実験SOP」に示すが、本研究での実験手順の概略を以下に示す。
使用動物：雌のCBA/JNCrlj マウス（8週齢にて入荷）

投与群設定：被験物質に合わせた溶媒を用いる溶媒対照、陽性対照（50% hexyl cinnamic aldehyde/A00 溶液）、および3用量の被験物質群あたり動物数：1群あたり4匹

溶媒：事前に被験物質候補リスト（資料4）に記載された溶媒を用いて、被験物質ごとに設定された濃度に調製後、遮蔽下で送付される。

測定指標：BrdU測定キットを用い、吸光度でBrdU取り込み量を測定

試験操作：図1に概略を示す。

- ① 両耳介に被験物質を3日間続けて塗布する。
- ② 最終感作の約48時間後に、BrdU 0.5 mLを1回腹腔内投与する。
- ③ BrdU投与の約24時間後に、リンパ節を採取する。
- ④ リンパ節をつぶし、緩衝液を15mL加えて均一な細胞懸濁液を作製し、BrdU測定キットを用い、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定する。この値が0.2を超える場合には細胞懸濁液の冷蔵保存液を翌日以降希釈して、再測定に用いることができる。

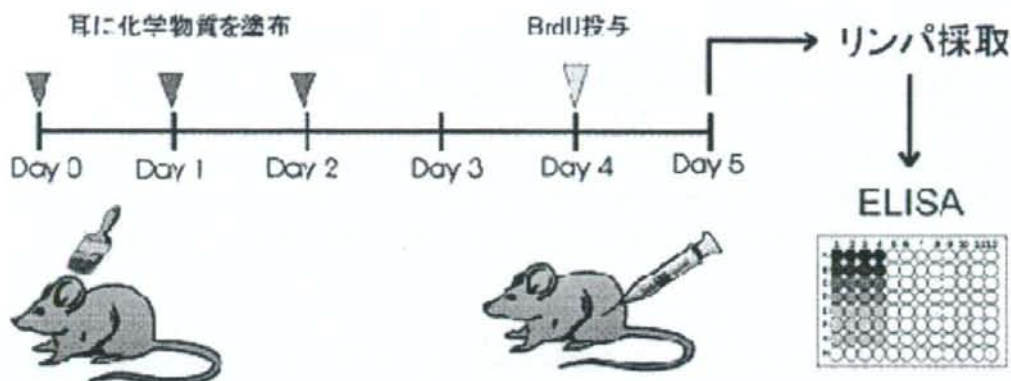


図1. LLNA-BrdU操作法

結果の評価：各個体の BrdU 測定値（吸光度）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 SI 値およびその標準偏差および標準誤差を算出し、被験物質投与群の SI 値の平均値が 2 を超える場合を陽性と判定する。

1 回に実施する被験物質数：1 回の操作で 2 被験物質および陽性対照物質を実施する。（ただし、被験物質数のバランスをとる関係で、ある 1 施設に関しては 1 回の操作で 3 被験物質を実施したという例外がある。）

2.3 操作法の普及

2.3.1 技術研修会

各実験施設の実験担当者が LLNA-BrdU 法の原理と操作法を理解できるように技術研修会を実施した。2006 年 7 月 11 および 12 日に国立医薬品食品衛生研究所（用賀）で技術研修会を実施した（図 2-1 および 2-2）。技術研修会では、研究計画書、SOP、記録用紙、データシートの説明と実験の操作法の実習が行われた。各施設から少なくとも一人の実験担当者が技術研修会に参加し、技術研修を受けた。さらに、確認用の映像資料も配布された。



図2-1 実験風景



図2-2 会議風景

2.3.2 予備実験

作成された SOP で十分な実験が行えるかどうかを確認するために、7月3日の第一回実行委員会において、