

評価委員会は一次評価報告書において「リンパ節細胞数など他の指標と比較して ELISA 法を用いることの優位性について説明が必要である」と記述し、説明を求めている。本試験に関わる ELISA 法は費用面、労力面でリンパ節細胞数の測定に劣るのではないかと懸念があったためである。これに対し、本試験法の提案者である武吉博士より「BrdU 測定の細胞数計測に対する優位性について」という回答文書が提出され、その中で、Ulrich らの論文の細胞計測値と武吉博士が ELISA 法を用いて測定した BrdU の測定値を、SI 値を用いて比較し、細胞数計測に比べ、BrdU 取り込み量を基にした方が、低濃度域から高い SI 値を示し、BrdU 取り込み量が細胞数に比べて感度が高いと考察された。それに対し、評価委員より「Ulrich らの用いた動物は雌性 BALB/c マウスで、武吉博士が用いた雌性 CBA/JN マウスとは異なる。LLNA における反応性は BALB/c は CBA/JN に比較して弱いことが推測できる。また、実施した施設も異なる。これでは、両者のデータを比較することができず、両者のデータの差は細胞数計測や BrdU 取り込みといった測定方法による違いではなく動物の感受性や施設による違いであるということを示すことができない。したがって、BrdU 測定の細胞数計測に対する優位性はこのデータからは示すことはできないと考える。同じ施設で同じ系統の動物を用いて試験条件を同一にして試験を行い、測定部分だけを変えたデータが必要である」とのコメントが出され、更なる説明が求められた。これに対して、武吉博士より細胞計測値と BrdU 法測定値を厳密に比較し、BrdU 法の方が高感度であることを示したデータは無いが、BrdU 法は細胞分裂の度合い（セル・ターンオーバー）を指標としており、原理的に見て細胞数測定よりも LLNA に近いと回答された。評価委員会は、この回答を了承した。

C-6) 試験成立基準

試験成立基準の設定の経緯を以下に示す。

第 1 実験では 12 被験物質を用い、9 施設でバリデーション研究が実施されたが、最終評価の指標となる SI 値は施設ごとに大きくばらついていた。この原因として、バリデーション実行委員会は溶媒対照群における吸光度が小さくなった場合、SI 値の増大を招いてしまうことがあると考察した。そして、この第 1 実験の結果を受けて、バリデーション実行委員会では試験が成立する吸光度の範囲を規定し、吸光度が下限未満とならないように細胞浮遊液の最終容量を事前に検討すると共に、上限を超える場合には、細胞浮遊液を希釈することにより規定範囲内に吸光度を収め、SI 値のばらつきを小さくすることが必要であろうと考えた。これを検証するため、第 1 実験に参加した 9 施設で希釈の影響の検討が、溶媒対照群の BrdU 取込み量を示す吸光度の測定によって行われた。その結果、3 施設では、溶媒対照群の吸光度が規定した範囲の下限未満となったが、そのうちの 1 施設では細胞浮遊液の調製に用いる生理食塩液の容量を少なくすることで溶媒群の吸光度が 0.145 となり、0.1~0.2 の範囲内に収めることができた。この 1 施設及び他の 6 施設も実測で 0.102~0.200 の範囲内に収めることができ、SI 値は安定していた。この検討結果を受け、溶媒対照群の吸光度の範囲を 0.1~0.2 と明記した新たな実験実施手順書を作成し、10 物質を用いて 7 施設により第 2 実験を実施した。しかしながら、その結果は、溶媒対照群の BrdU 取込み量を示す吸光度として規定した 0.1~0.2 の範囲内に収めること等の事前に決めた実験の成立基準を満たすことができた実験は全体の約 6 割であった。この結果に対し、バリデーション実行委員会は、事前に定めた基準が厳しすぎたこと、並びに細胞浮遊液をさらに希釈することがばらつきを生むと考察した。そこで、バリデーション実行委員会は、コードが開示され、結果を確認した後になるが、結果の採用基準を緩和し、保存後に

希釈した試料での測定を行わないという基準での解析を行った。すなわち、溶媒対照群の BrdU 取り込み量を示す吸光度を 0.1~0.2 前後にするように事前に細胞浮遊液の最終容量を決めることとし、吸光度が基準値より大きくなった場合でも細胞浮遊液の希釈は行わないとした。さらに陽性対照物質 HCA の濃度 50%における SI 値が 2 以上を試験成立条件とした。その結果、SI 値の濃度依存性はごく一部を除いて認められ、概ね施設内差・施設間差は小さく、LLNA や他の動物実験との対応は良好となった。

評価委員会は、バリデーション研究報告書に記載された主な解析結果がコード開示後になされたことに対し、本来のバリデーションのあり方に則っておらず、重大な問題として受け止めたが、得られた試験結果（動物試験データでもある）を最大限有効に活用するという点を重視し、この解析結果を評価することとした。

試験成立基準設定の経過に関して、評価委員会は細胞浮遊液を希釈した時に倍率通りの結果が得られない理由を確認した。その結果、細胞浮遊液をさらに希釈すると、細胞の均一な懸濁が保たれていないと考えられるような測定値が頻発し、ばらつきが大きくなるとの回答があった。また、バリデーション研究報告書に記載されている「事前に溶媒対照群の BrdU 取り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」との試験条件に関し、評価委員会は、例えば吸光度 0.05~0.35 を試験成立の範囲とするなど、明確な試験成立範囲を提示しないと施設間でのばらつきの原因になるのではないかと懸念を表明した。これに対し、事前検討における溶媒対照群の BrdU 取り込み量を示す吸光度を 0.1~0.2 前後とすれば、本実験における吸光度は 0.05~0.35 に入るはずであるとの回答があった。そこで、最終的に本実験における溶媒対照群の BrdU 取り込み量の平均吸光度 0.05~0.35 および陽性対照物質 HCA の濃度 50%における SI 値が 2 以上を試験成立条件とするという結論に至った。

第 2 実験のデータ解析において希釈しないで評価するのであれば、第 1 実験は希釈しないで試験を実施した施設が 9 施設中 8 施設であり、第 1 実験のデータを無視することなく、第 1 実験と第 2 実験を合わせた解析を実施すべきではないかとの意見も示されたが、第 1 実験と第 2 実験では被験物質の調製法や細胞浮遊液の調製法が異なる条件で実施されたことから、合わせた解析は好ましくないと考えるとのバリデーション実行委員長の見解もあり、第 2 実験のデータのみで判断することとした。

C-7) バリデーションデータの除外

バリデーションデータの除外に関して、第 2 実験の Isopropanol の施設 1 と 6 の低濃度投与群において SI 値が 2 を超えているにもかかわらず陰性としている点が注目された。このようなデータを採用しないことについては、バリデーション前に規定していなかったことであるため、本来のバリデーションの進め方に反するからである。この件に関し評価委員会は、低濃度投与群でばらつきが大きいために SI 値がわずかに 2 を超えたのみであり、中濃度投与群および高濃度投与群では陰性であったことから、バリデーション実行委員会が Isopropanol の施設 1 と 6 の結果を陰性としたことは、妥当と判断した。そして、このような場合以外は SI 値が 2 を超えた時、たとえわずかであっても陽性として評価されていることを確認した。

C-8) 再現性評価の指標

評価委員会は第 2 実験における施設内再現性、施設間再現性を評価する場合の指標として、LLNA-DA 法の時に用いられた t^2 が今回も用いることができるのではないかとバリデーション実行委員会へ意見した。

これに対しバリデーション実行委員会は、 τ^2 は再現性評価の補助手段に過ぎず、LLNA-DA法の時もそのような位置づけであったと回答した。回答書には、「 τ^2 は対数SI値における施設間分散である。各施設の個々の実験から得られたSI値（もしくは対数SI値）のみを用いて、分散を推定した場合、SI値そのものばらつきを考慮していないことになる。そこで各実験の対数SI値の分散を施設間と実験内に分解し、施設間に相当する分散を τ^2 とした。理想的には、 τ^2 のような指標に関して、事前に許容できる値を設定し、研究を行うべきであるが、そのようなことはLLNA-DA法の研究でも行っていない。また、我々はその経験も少ない。さらに、この指標が適切に施設間差を評価しているかどうかについては十分な検討が必要であり、LLNA-DA法の研究でもグラフを中心に考察を行い、 τ^2 はその補助指標として導入したに過ぎなかった」と記載されている。そして、参考としてLLNA-BrdU法の第2実験で求めた施設間差に関する τ^2 の結果が提示された。

C-9) 施設内再現性

LLNA-BrdU法の施設内再現性については、第2実験の陽性対照のSI値の結果により検討した。バリデーション研究報告書によると各施設のSI値のばらつきはそれほど大きくないため、施設内再現性は良好とされていた。しかしながら、施設5の陽性対照群のSI値は他の施設に比べて大きくばらついており、原因もわからなかった。評価委員会は概ね再現性は良好であるが、まれに何らかの理由で異常な値が得られることがあるので、試験実施にあたっては陽性対照のSI値に留意が必要であると考えた。

C-10) SI値の施設間再現性

LLNA-BrdU法の施設間再現性については、第2実験での各施設、各被験物質、各濃度毎のSI値の結果により検討した。施設5の2,4-Dinitrochlorobenzene、Glutaraldehyde、Formaldehyde、Hexylcinnamic aldehyde及び施設7のLactic acidは他の施設に比べて高いSI値であった。一方、施設5と7は陽性対照物質でも他の施設に比べ高いSI値を示していた。他の施設では良い再現性が得られたことから、評価委員会は陽性対照のSI値に留意して試験を実施すれば、本法の再現性は概ね良好な結果が得られると考えた。

また、バリデーション実行委員会よりLLNA-BrdU法の第2実験で求めた τ^2 の結果が提示されたので、評価委員会ではそれに基づいて補助的に施設間再現性を検討した。その結果、10施設の3濃度段階における τ^2 の計算値30個のうちLLNA-DA法における暫定的な基準である0.182を上回る値は10個、そのうち4個は0.2~0.3程度でそれほど大きな値では無かった。高濃度、中濃度、低濃度のいずれの濃度でも0.182を超える物質は2,4-Dinitrochlorobenzene、Glutaraldehydeの2個であり、このうち2,4-Dinitrochlorobenzeneは0.3をわずかに上回る程度であった。1物質Glutaraldehydeを除いて概ね施設間再現性は良好であった。評価委員会は、バリデーション研究（第2実験）報告書の25~26ページの図からの視覚的な判定を主とし、施設間再現性評価の補助的手段として τ^2 を用いて検討し、LLNA-BrdU法の施設間再現性は概ね良好であると考察した。なお、 τ^2 の暫定的な基準である0.182は、LLNA-DA法の時に用いられた指標 $\exp(\tau^2)$ の1.2に該当する数値である。

C-11) 感作性の有無の判定の施設間再現性

LLNA-BrdU法の施設間再現性については、第2実験での各施設の感作性の有無の判定結果により検討した。施設間で食い違う判定をした被験物質は、7つの陽性物質（28試験）の内 Formaldehyde と3つの陰性物質（12試験）の内 Lactic acid で、それぞれ1施設が他の2施設と異なる判定を示したのみであったことから、評価委員会は感作性の有無の判定の施設間再現性は概ね良好であると考えた。

C-12) 技術移転性

技術移転性については、バリデーション研究報告書には記載されていないが、平成20年11月14日に開催された代替法学会の21回大会において、協和メディカルサービス株式会社の兵頭洋平先生と大阪大学の寒水孝司博士の共同研究「動物実験代替法のバリデーションにおけるtransferabilityの統計的評価法に関する研究」で解析結果の発表（兵頭ら、2008）があった。寒水博士はLLNA-BrdU法のバリデーション実行委員で解析の担当者である。その発表内容は、技術移転性を2段階で評価するものであり、第1段階では提案施設の背景データのばらつきから得た基準範囲に各施設がおさまるか否かで評価して、能力を有する（Competent）施設を選択し、第2段階ではCompetent施設のデータに施設と実験を変量とした二次元配置変量効果モデルを当てはめ、データのばらつきを、施設間分散、実験間分散、繰り返し誤差に分解し、データのばらつきに占める実験間分散の割合（級内相関係数）を求め、その値によって技術移転性を評価しようとするものであった。その結果は本LLNA-BrdU法は第1段階において7施設中3施設が限界値を超えたために技術移転性が低いというものであった。ただし、発表の際に「提案施設の分散がかなり小さいので技術移転性の評価が厳しくなった」と述べている。

このような報告が行われ、一方でバリデーション実行委員会の作成した報告書には技術移転性についての記載が無かったため、評価委員会はバリデーション実行委員会に対し、技術移転性に関する見解を求めた。これに対し、寒水博士と武吉博士の連名で「今回の結果は第一段階のCompetent施設選定に用いる提案施設の背景データのばらつきが極めて小さい（極めて再現性の良い結果が得られている）ため、結果として他の実験施設のばらつきを過大評価する結果となったものと考えられる。また、competent施設と判断された4施設における級内相関係数 ρ_i は0.06と極めて低い値となっており、試験法に習熟することにより、極めて再現性及び精度の高い試験法であり、高い施設間再現性が期待できる方法であると判断される。なお、今回の発表内容は研究段階の手法についてのものであり、現時点で本法を含めtransferability評価のGold standardといわれる手法がない現状では、本法の結果のみでtransferabilityの評価を行うことは適切ではないと考える。」との回答があった。バリデーション実行委員会からは、代替法学会における研究がバリデーション実行委員会と無関係の研究であるとの位置づけの表明、並びに技術移転性についてはバリデーション実行委員会で検討したことはなく、寒水博士と武吉博士による回答が本件に関する全てであるとのコメントがあった。これを受けた評価委員会は、技術移転性についてバリデーション実行委員会で検討されていない、技術移転性を評価する標準的手法が無い現状においては、LLNA-BrdU法が技術移転性のある試験法なのかどうかについては明確な評価はできないと結論した。しかしながら、評価委員会は寒水博士と武吉博士による回答にあるようにcompetent施設と判断された4施設における施設間再現性は極めて高く、試験法に習熟することにより、再現性及び精度の高い試験が可能となる事、並びに技術移転性を高めるための方法がバリデーション研究報告書や実験手順書で明示されている事などから、本試験法を実際に使用する場面において技術の移転に関して支障となることは無いと推察した。

C-13) 代替可能性

代替可能性を検討する際の陽性、陰性の判定法として、重み付き平均による方法並びに施設間で食い違う判定の場合に多数の結果を採用する方法(多数決)が考えられる。今回のバリデーション研究で採用されたのはLLNA-DA法の時と同様に重み付き平均による方法であった。評価委員会では両者ともそれぞれに意味のある代表値と考え、多数決による方法についても念のため検討した。その結果、両者の結果は一致しており、どちらを採用しても代替可能性の評価は同じであることを確認した。

LLNA-BrdU法のLLNA法に対する感度(sensitivity:陽性物質を陽性と判定する能力)、特異性(specificity:陰性物質を陰性と判定する能力)、陽性予測度(positive predictivity:陽性との結果が得られた物質が陽性である割合)、陰性予測度(negative predictivity:陰性との結果が得られた物質が陰性である割合)、一致度(accuracy:判定結果が正確である割合)について、第2実験での感作性判定結果に基づき検討した。その結果は表4に示すとおり、感度、特異性、陽性予測度、陰性予測度、一致度はそれぞれ100、75.0、85.7、100、90.0%であり、いずれも高い値であった。

なお、LLNA-BrdU法とLLNA法で一致しなかった物質はNickel sulfateであった。この物質はLLNA法で陰性の報告が多いので今回の検討ではLLNA法陰性物質として分類している。LLNA法で陽性とのRyanら(2000)の報告も認められる。ヒトにおいては、感作性の報告が多く認められ、陽性物質として分類されている。動物の系統、適用法、エンドポイントをはじめ、どのような試験条件の場合に陽性が得られるのかは、今回のデータを含め、今後も注視していく必要がある。

評価委員会は本バリデーションにおけるLLNA-BrdU法のLLNA法に対する感度、特異性、予測度、一致度に基づきLLNA法を代替できる可能性を考えたが、バリデーションで用いた10物質の結果と一次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-BrdU法による代替の可能性について結論できなかった。そこで、LLNA法とLLNA-BrdU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-BrdU法による代替可能性の考察

申請者は30物質についての自家試験結果及び第2実験に使用された化学物質の総合判定結果をまとめて評価委員会に平成20年12月19日に提出した。それによると、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18物質のうち15物質がLLNA-BrdU法で陽性であった(感度83%)。また、LLNA法で陰性とされた12物質のうち11物質でLLNA-BrdU法で陰性であった(特異性92%)。陽性予測度は94%、陰性予測度は79%、一致度は87%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-BrdU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。

これらの結果から、評価委員会は、LLNA-BrdU法が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-BrdU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-BrdU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-BrdU 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、皮膚感作性の有無を評価する LLNA 法の代替として有用であると判断された。

参考文献

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 Chem Toxicol* 34 (10), 985-97.

Basketter, D., Cockshott, A., Corsini, E., Gerberick, G. F., Idehara, K., Kimber, I., Van Loveren, H., Matheson, J., Mehling, 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. The report and recommendations of ECVAM Workshop 65. *Altern Lab Anim* 36 (2), 243-57.

Kimber, I., Mitchell, J. A., and Griffin, A. C. (1986). Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. *Food Chem Toxicol* 24, 585-586.

OECD (2002) OECD guideline 429 Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, Adopted 24th April 2002. Takeyoshi, M., Sawaki, M., Yamasaki, K., and 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 (2-3), 259-63.

Ryan C. A., Gerberick, G. F., Cruse, L. W., Basketter, D. A., Lea, L., Blaikie, L., Dearman, Warbrick, R. J., E. V. and Kimber, I. (2000). Activity of human contact allergens in the murine local lymph node assay. *Contact Dermatitis*. 2000 Aug;43 (2) :95-102.

Takeyoshi M, Sawaki M, Yamasaki K, Kimber I. 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. 2003.

Yamashita, K., Idehara, K., Fukuda, N., Yamagishi, G., and Kawada, N. (2005). Development of a modified local lymph node assay using ATP measurement as an endpoint. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation* 11, 136-144.

兵頭洋平, 寒水孝司 (2008) 動物実験代替法のバリデーションにおける transferability の統計的評価法に関する研究, 日本動物実験代替法学会第 21 回大会要旨集, 158-159, 埼玉.

以上

表1 LLNA-BrdU バリデーション実行委員および所属施設

番号	氏名	所属	役割
1	大森 崇	京都大学大学院医学研究科医療統計学分野	データ管理
2	小島肇	国立医薬品食品衛生研究所薬理部	委員長
3	寒水孝司	大阪大学臨床医工学融合研究教育センター	割付とデータ管理・解析
4	吉村 功	東京理科大学工学部経営工学科	無任所
5	出原賢治	ダイセル化学工業(株) 評価・解析センター	動物手配, 実験
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	実験
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	実験
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	実験(第1実験のみ), 技術指導
9	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	実験
10	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	実験(第1実験のみ)
11	有馬和範	大正製薬(株) 安全性研究所	実験
12	湯浅敦子	富士フイルム(株) CSR 推進部 環境・品質マネジメン	実験

		ト部素材試験センター	
13	牧栄二	(財) 食品農医薬品安全性評価センター	実験

表2 パリテーションで用いられた被験物質

物質名	LLNA 法における感作性の有無と程度	第1実験	第2実験
2,4-Dinitrochlorobenzene	非常に強い	○	○
Glutaraldehyde	非常に強い	○	○
Cobalt chloride	強い	○	
Formaldehyde	強い	○	○
3-Aminophenol	中程度	○	
Cinnamic aldehyde	中程度		○
Hexylcinnamic aldehyde	中程度	○	○
Isoeugenol	中程度	○	
Abietic acid	弱い	○	
Eugenol	弱い		○
Dimethyl isophthalate	無し	○	
Isopropanol	無し	○	○
Lactic acid	無し		○
Methyl salicylate	無し	○	○
Nickel sulfate	無し*	○	○

*: ヒトでは陽性と報告されている。

表3 各施設での個々の物質の判定結果 (第2実験)

物質名	LLNA法における感 作性の有無と程度	施設	施設	施設	施設	施設	施設	施設
		1	2	3	4	5	6	7
2,4-Dinitrochlorobenzene	非常に強い	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
Glutaraldehyde	非常に強い	陽性				陽性	陽性	
Formaldehyde	強い	陽性				陽性	陰性	
Cinnamic aldehyde	中程度		陽性		陽性	陽性		
Hexylcinnamic aldehyde	中程度	陽性		陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
Eugenol	弱い		陽性				陽性	陽性
Isopropanol	無し	陰性		陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
Lactic acid	無し			陰性	陰性			陽性
Methyl salicylate	無し	陰性	陰性	陰性				
Nickel sulfate	無し*			陽性	陽性			陽性

*: ヒトでは陽性と報告されている。

表4 代替可能性の指標 (第2実験)

	N	感度	特異性	陽性予測度	陰性予測度	一致度
LLNA-BrdU法*	10	100%	75.0%	85.7%	100%	90.0%
vs LLNA法		(6/6)	(3/4)	(6/7)	(3/3)	(9/10)

*: 被験物質個々の感作性評価については、多数の施設での判定結果に基づいた。

表5-1 : LLNA-BrdU 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)

chemical name	判 定 結 果			
	LLNA-BrdU	LLNA*	GMPT/BA*	HMT/HPTA*
2,4-dinitrochlorobenzene	+	+	+	+
p-phenylenediamine	+	+	+	+
glutaraldehyde	+	+	+	+
trimellitic anhydride	+	+	+	+
formaldehyde	+	+	+	+
cinnamic aldehyde	+	+	+	+
isoeugenol	+	+	+	+
eugenol	+	+	+	+
hexyl cinnamic aldehyde	+	+	+	ND
mercaptobenzethiazol	-	+	+	+
citral	+	+	+	+
hydroxycitronellal	-	+	+	+
p-Benzoquinone	+	+	ND	ND
diphencyclopropenone	+	+	ND	+
m-Aminophenol	+	+	+	+
linalool	-	+	ND	+
Isopropyl myristate	+	+	ND	-
p-Chloroaniline	+	+	+	ND
Nickel sulfate	+	-	+	+
Aniline	-	-	+	+
Glycerol	-	-	ND	-
Propylene glycol	-	-	ND	+
Dimethyl isophthalate	-	-	-	ND
diethylphthalate	-	-	ND	-
methylsalicylate	-	-	-	-
lactic acid	-	-	-	ND
hexane	-	-	ND	-
isopropanol	-	-	-	ND
3-(4-Isopropyl) isobutyraldehyde	-	-	ND	ND
2-Hydroxypropylmethacrylate	-	-	ND	+

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

C. A. Ryan et al., Contact Dermatitis. 43: 95-102, 2000

<http://www.inchem.org/documents/sids/sids/TLANA.pdf>

GMPT: Guinea pig maximization test, BA: Buehler assay

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

表5-2 : LLNA-BrdU 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-BrdU 試験 結果	+	2,4-dinitrochlorobenzene p-phenylenediamine glutaraldehyde trimellitic anhydride formaldehyde cinnamic aldehyde isoeugenol eugenol hexyl cinnamic aldehyde citral p-Benzoquinone diphencyclopropenone m-Aminophenol Isopropyl myristate p-Cloroaniline	Nickel sulfate
	-	mercaptobenzethiazol linalool hydroxycitronellal	Aniline Glycerol Propylene glycol Dimethyl isophthalate diethylphthalate methylsalicylate lactic acid hexane isopropanol 3-(4-Isopropyl) isobutyraldehyde 2-Hydroxypropylmethacrylate

+ : 感作性試験結果が陽性、- : 感作性試験結果が陰性

表 5 - 3 代替可能性の指標

	N	感度	特異性	陽性予測度	陰性予測度	一致度
LLNA-BrdU 法*	30	83%	92%	94%	79%	87%
vs LLNA 法		(15/18)	(11/12)	(15/16)	(11/14)	(26/30)

4) 皮膚刺激性試験代替法の第三者評価

研究要旨

3次元皮膚モデルEPISKINを用いたin vitro皮膚刺激試験法の承認に関するESACの評価結果は、納得できるものであることが確認され、R38表示による化学物質の分類を予測するin vitro試験として有用な方法であることが確認された。

A. 研究目的

欧州代替法バリデーションセンター (ECVAM) で行われた第26回会議(2007年4月26日)において、ECVAM科学諮問委員会の非理事会メンバー (ESAC) によって提出された3次元皮膚モデルEPISKINを用いたin vitro皮膚刺激試験法の承認に関するESACのstatementについて評価した。

ESACの評価は、欧州で1998年から開始された、ウサギによる皮膚一次刺激性試験結果を予測できる試験法探索のためのECVAM皮膚刺激タスクフォースから提出された正式バリデーション報告書をもとに実施されている。このバリデーションの目的は、現在行われている欧州でのR38表示 (EU classification system: 皮膚刺激性物質をR38として分類表示し、非刺激性物質を表示しない) による化学物質の分類をin vitro試験が予測できるかどうかを評価することであった。

B. 研究方法

B-1) 皮膚刺激性評価委員会委員 委員長

岡本裕子(コーセー)

委員

寒水孝司(大阪大学)

森本隆史(住友化学)

杉林堅次(城西大)

鹿庭正昭(国立医薬品食品衛生研究所)

赤松浩彦(藤田保健衛生大学)

B-2) 皮膚刺激性ワーキンググループ

委員

寒水孝司(大阪大学)

實川節子(ロレアル)

鳥島久(クラボウ)

山口達也(東洋紡)

森川訓行(グンゼ)

小島肇(国立医薬品食品衛生研究所)

B-3) 方法

3次元ヒト皮膚モデルEPISKINを用いたin vitro皮膚刺激試験法の概要は、試験物質を

皮膚の表面に15分接触させ、更に42時間培養後、MTTの還元を用いた組織生存率を測定し、50%生存率を識別点として刺激性を識別するものである。バリデーション研究において、良好な結果が得られたことから、ESACは、3次元ヒト皮膚モデルであるEPISKINを用いた試験法が、ウサギ皮膚刺激性を予測するため、またR38表示を区別する目的で使用されるDraize皮膚刺激性試験(OECD TG 404およびEU危険物指令Directive 67/548/EECの付属Annex Vに記載の試験法B.4)を代替する、信頼性があり適切なスタンド・アローンの試験法であると評価した。また、特異性を損なわずに感受性を向上させる可能性があるという理由で、IL-1 α の放出測定による判定を追加することが、MTT還元法で得られた陰性判定を確定するために有効な補助法であると判断している。

C. 結果および考察

本委員会では、ESACが評価した資料について検証・確認を行い、以下の結論を得た。

① ウサギによる皮膚一次刺激性試験が、人の皮膚の損傷を評価するのに対し、本試験法ではヒト細胞を用いた三次元モデルを用いることから、代替試験として科学的に妥当である。

② この方法は、OECDのTG 404を代替するものと明記されており、試験法適用の目的が化学物質の皮膚刺激表示R38(2段階)およびGHS(3段階)の表示の識別評価に用いるためと明記されている。

③ 試験プロトコルは、皮膚モデルへの試験物質暴露方法とその細胞毒性評価にいたる詳細なプロトコルが存在している。またその内容も本試験が正確に実施できるようなものであると判断できる。

④ OECDのGuidance Document on the

Validation and International Acceptance
of

New or Updated Test Methods for Hazard
Assessment (No. 34)に基づいてバリデー
ションがなされている。

- ⑤ ヒト皮膚モデルの製造に関し、生産施設の
監査が実施され、品質確認されている。
- ⑥ バリデーショナルマネジメントチームが
組織され、その中に生物統計の専門家が含
まれている。
- ⑦ バリデーショナル結果が専門家に評価され
ている点から得られたデータの信頼性・
質・正確性は国際水準を満たしていると判
断できる。
- ⑧ データ解析において、施設内変動性、施設
間変動性について評価しており、施設内再
現性・施設間再現性に問題はないものである。
- ⑨ 58種の試験資料は、in vivo データが入
手できる既存の信頼できる3つのデータベ

ースに3登録されているものから選択され
ており、選択基準は妥当である。陰性コン
トロールはPBS、陽性コントロールは
0.5%SDS が設定されている。

D. 結論

以上より、資料4-2に示す3次元皮膚モデル
EPISKIN を用いたin vitro 皮膚刺激試験法
の承認に関するESAC の評価結果は納得でき
るものであることが確認され、R38 表示によ
る化学物質の分類を予測するin vitro 試験
として有用な方法であることが確認された。

D. 資料

資料4-1

資料4-2

ESAC statement 翻訳

ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺
激性試験代替法の第三者評価報
告書

欧州委員会
JRC 理事会
共同研究センター
保健・消費者保護研究所
欧州代替法バリデーションセンター(ECVAM)

皮膚刺激性 IN-VITRO 試験の妥当性に関する声明書

2007年4月26-27日にイタリアのイスプラにある欧州代替法バリデーションセンター(ECVAM)で行われた第26回会議において、ECVAM 科学諮問委員会の非理事会メンバー(non commission members)は全員一致で以下の声明を支持した。この支持表明はバリデーションの対象となった以下の in-vitro 試験に関する科学的報告書およびピア・レビューを受けた文献を検討した結果である。

1. EpiDerm(MTT の還元および IL-1 α の放出)；
2. EPISKIN(MTT の還元および IL-1 α の放出)；

両者のうち、EPISKIN 法に、(付属書類に示された試験の成績に基づいて)結果の判定に MTT の還元を用いた場合、ウサギ皮膚刺激性を予測するための、また R38 と表示される皮膚刺激物質と非表示物質(非刺激物質)を区別するための Draize 皮膚刺激性試験(OECD TG 404 & EU 危険物指令 67/548/EEC の Annex V の B.4)を代替する、信頼性があり適切なスタンド・アローン(stand alone)法である証拠が得られた。現時点では、特異性を損なわずに感受性を向上させる可能性があるという理由で、IL-1 α 放出量測定を追加することが MTT 還元法の有効な補助法と見なすことができる。この判定法は MTT 還元法で得られた陰性判定を確定するために使用可能であろう。

EpiDerm モデルは特異性が高く、現時点では、皮膚刺激性物質を高い信頼性を以って同定できたが、陰性と判定された結果は更なる試験が必要であろう(例えば、OECD TG 404 に示されているような、段階的戦略によって)。EpiDerm はプロトコールを改良すれば、試験の感受性が向上するはずである。

この支持表明はピア・レビューのために準備された資料を参考にしている。また、独立した専門家が定義された判定基準に対して資料を評価した意見、Management Team によって作成された追加資料、バリデーションプロセスを監督するために任命された Peer Review Panel の意見を参考にしている。

Thomas Hartung
ユニットチーフ
ECVAM

保健・消費者保護研究所
共同研究センター
欧州委員会
イスブラ

2007年4月27日

1. ESAC は欧州委員会によって設立され、欧州連合(EU)加盟国、産業界、大学、動物愛護団体および欧州委員会の関連部門の代表によって構成されている。

この声明は ESAC の以下のメンバーによって支持された。

Ms Sonja Beken (Belgium)
Ms Dagmar Jírová (Czech Republic)
Mr Tõnu Püssa (Estonia)
Mr Lionel Larue (France)
Mr Manfred Liebsch (Germany)
Ms Annalaura Stamatì (Italy)
Mr Jan van der Valk (The Netherlands)
Mr Constantin Mircioiu (Romania)
Mr Albert Breier (Slovakia)
Mr Argelia Castanõ (Spain)
Mr Patric Amcoff (Sweden)
Mr Jon Richmond (UK)
Mr Carl Westmoreland (COLIPA)
Ms Vela Rogiers (ECOPA)
Ms Nathalie Alépée (EFPIA)
Mr Robert Combed (ESTIV)
Mr Hassao Seibert (European Science Foundation)

以下の欧州委員会の行政部門およびオブザーバー組織は諮問プロセスには参加したが、支持プロセスには参加していない。

Mr Thomas Hartung (ECVAM; chairman)
Mr Jens Linge (ECVAM; ESAC secretary)
Ms Susanna Louhimies (DG Environment)
Ms Barbara Mentré (DG ENTR)
Ms Grace Patlewicz (ECB, DG JRC)
Mr Christian Wimmer (DG Research)
Mr Hajime Kojima (JACVAM)

Ms Laurence Musset (OECD)
Mr Barry Philips (Eurogroup for Animal Welfare)
Mr William Stokes (Spain)
Mr Patric Amcoff (NICEATM, USA)

付属書類

ECVAM の皮膚刺激性試験法バリデーションについての概略

広範囲にわたる最適化とプレバリデーション活動(下記、SIVS の背景を参照)の後に、ECVAM は 2003 年に 3 種の in vitro 試験についての正式なバリデーションを開始した。そのうちの 2 種は再構成ヒト表皮モデル (EPISKIN, EpiDerm) を用いるもので、もう一種の skin integrity function test (SIFT) はマウスの皮膚を用いる ex vivo 試験である。

このバリデーションの目的は、58 種類の試験物質セットを用いてこれらの方法の妥当性(予測能力)と信頼性(施設内および施設間の再現性)を評価することにより、現在白兔を用いて行われている Draize 皮膚刺激性試験 (EU B.4 method; OECD TG 404) を代替することにあつた。

このバリデーションの最終目的は、皮膚刺激性物質を R38 と表示し、非刺激性物質を表示しない欧州のシステム (EU classification system) に従った in vivo 試験による化学物質の分類を in vitro 試験が予測できるかどうかを評価することであつた。さらに、化学物質の選択においては国際統一分類システム (Globally Harmonized Classification System, GHS) の 3 つのカテゴリー[強度(カテゴリー 2)、軽度(カテゴリー 3)、および非刺激性(カテゴリーなし)]の代表的なものを選択し、GHS の分類にしたがって、結果を事後に評価できるようになっていた。

このバリデーションは、OECD の *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (No.34) に示されている原則と基準に従って行われた。さらに、商業生産されているヒト皮膚モデルの品質を確認するため、ECVAM 皮膚刺激性試験バリデーション (ECVAM Skin Irritation Validation Study, SIVS) の開始時に、EPISKIN、EpiDerm の生産施設の監査が独立の審査機関によって行われた。

このバリデーションは、ECVAM がスポンサーとなり、主契約機関 (ZEVET-BfR, ドイツ) が研究をコーディネートし、プロジェクト管理は Management Team (MT、メンバーについては表 1 を参照) によって行われた。

表1 SIVS Management Team の構成

Chair (Dr Phil Botham)
Co-chair (Dr Julia Fentem)
Sponsor representative (Dr Valérie Zuang, <i>alternate</i> : Dr Chantre Eskes)
Independent biostatistician (Dr Sebastian Hoffmann)
Representative of the main contractor (Dr Horst Spielmann)
Representative of the CSSC (Dr Andrew Worth)
ECB customer (Dr Thomas Cole)
<u>Representatives of the test systems:</u>
EPSKIN (Dr Roland Roguet)
EpiDerm (Dr Manfred Liebsch)
<u>Observers from the US:</u>
ICCVAM (Dr Karen Hamernik; <i>alternate</i> : Dr Abby Jacobs)
NICEATM (Dr William Stokes; <i>alternate</i> : Dr Ray Tice)

SIVS で使用される試験物質を決定するために、Chemicals Selection Sub-Committee (CSSC) が任命された。試験物質は高基準の *in vivo* データを有するもので、それに対して *in vitro* 測定データを比較できるものを選定する必要があった。

European Centre for the Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC) データベースからの皮膚刺激性・皮膚腐食性標準物質はそれまでの研究に広く用いられてきたので、CSSC は可能な試験物質を得るために新規の情報源を利用することが求められた。この目的で、新規に販売される化学物質に関する申請制度の中心的情報集積である欧州連合の New Chemicals Database (NCD) から新規の化学物質が選択された。更に、製造・販売を行っている主要な企業からの即使用が可能な既存の化学物質も、Toxic Substance Control Act (TSCA) データベースや US Environmental Protection Agency (EPA) および ECETOC のデータベースのようなデータベースから得られた。既にプロトコールの最適化やプレバリデーションの段階で用いられた化学物質は排除された。

既存物質 25 種、NCD から選択された新規物質 33 種、総計 58 種の化学物質が選択され、SIVS の試験に用いられた。

選択された化学物質数は (a) R38 を非分類の物質から区別するために統計的に充分であり、(b) GHS 分類システムによる試験の性能を事後評価できるように、この 3 カテゴリーをバランスよく代表しており、(c) 浮腫や発赤スコアが 0 であるような可能な限り多岐に渡る物質群から成り立っている。これらの化学物質は、それぞれ個別にコードがつけられ、参加施設に配布された。

選択された化学物質は、さまざまな分子構造、置換基、機能や利用分野、さらに、広い物理化学的性質を示す。これらはチャレンジングな化学物質のセットであり、代替法がバリデートされようとしている現在の産業状況に対応している。