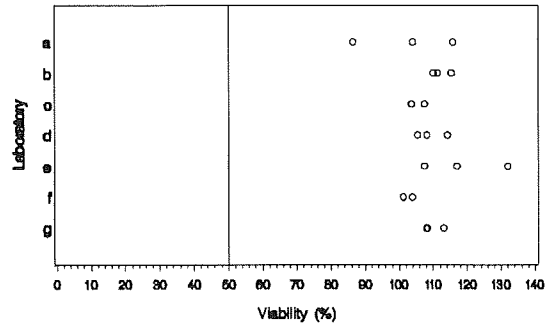
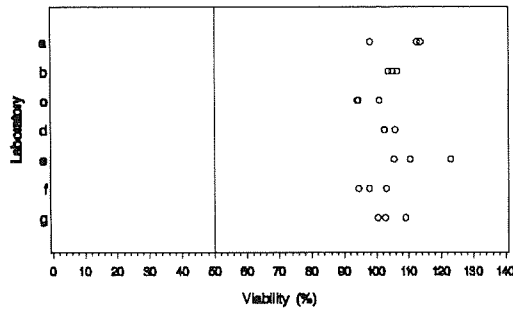


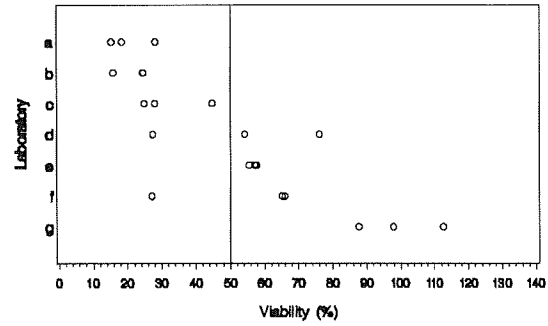
Chemical: 09 Vivo: no (1.7)



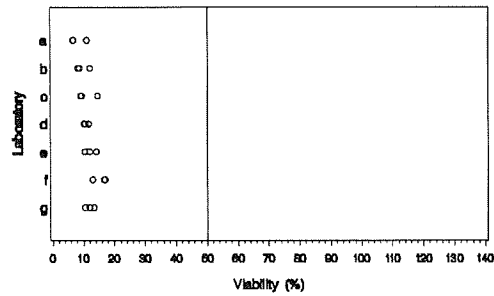
Chemical: 10 Vivo: no (1.7)



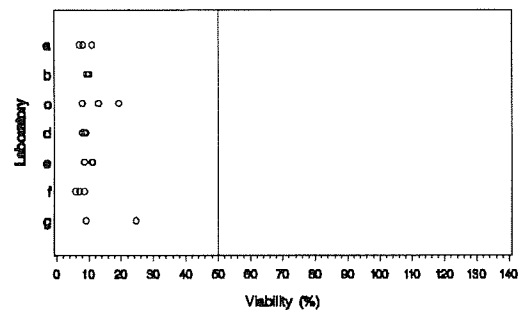
Chemical: 11 Vivo: R38 (2)



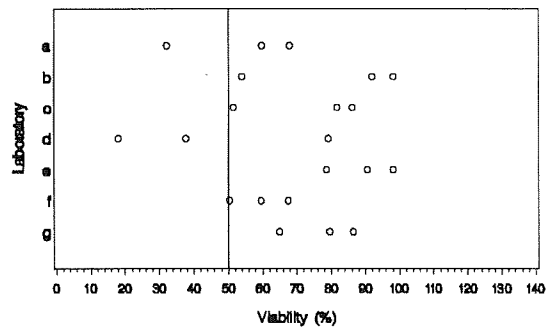
Chemical: 12 Vivo: R38 (2)



Chemical: 14 Vivo: R38 (2.3)



Chemical: 15 Vivo: R38 (2.3)



Chemical: 16 Vivo: R38 (2.7)

Fig. 4. continued

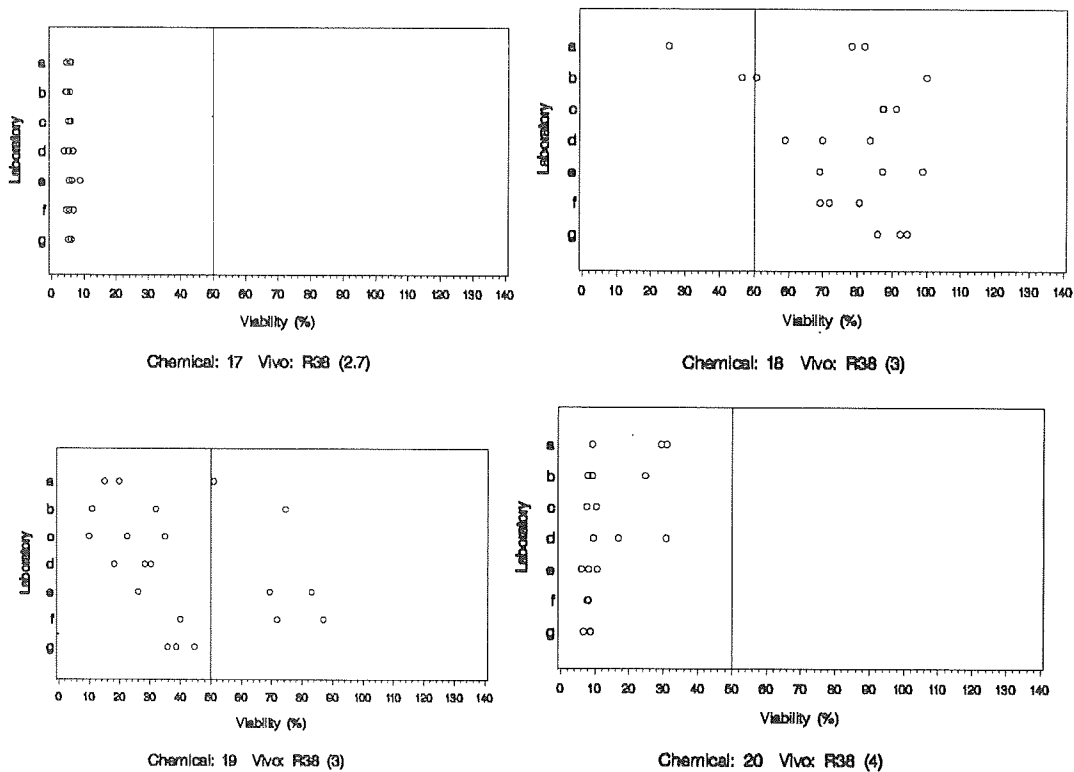


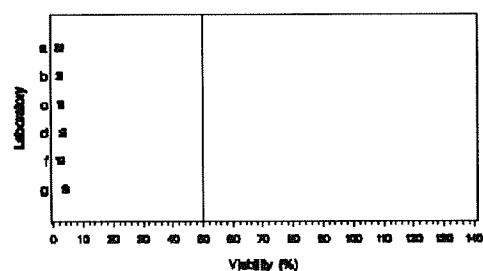
Fig. 4. continued.

Table 14. Viability of chemicals each laboratory by 3rd phase study

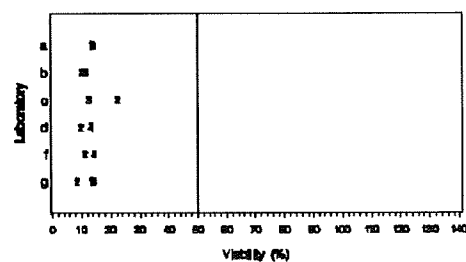
Chem.	Vivo	Score	Exp.	Lab.					
				a	b	c	d	f	g
A	no	2	1	13.3	11.8	13.2	13.8	11.4	13.7
			2	14.2	10.2	22.5	9.9	11.3	8.7
			3	14.0	11.1	12.3	13.2	14.3	14.3
B	Category 2	2.7	1	1.5	2.2	2.5	4.0	1.7	3.9
			2	3.1	2.2	2.9	3.0	2.6	3.7
			3	1.5	2.5	3.0	3.9	3.2	4.7
C	Category 2	3	1	0.7	0.7	0.7	6.9	0.8	1.0
			2	1.3	1.1	1.4	2.0	4.8	0.4
			3	0.5	0.8	1.0	0.8	1.0	0.3
D	Category 2	3.3	1	14.5	24.0	12.7	10.3	13.8	19.3
			2	13.6	16.0	12.5	18.3	8.8	15.2
			3	18.6	15.5	12.6	23.0	19.2	14.1
E	Category 2	3.3	1	3.9	3.4	3.4	8.2	3.2	4.1
			2	4.5	2.7	3.3	3.9	4.2	3.1
			3	1.8	3.5	3.5	3.7	5.0	5.1
F	Category 2	4	1	5.6	7.2	6.5	6.4	5.2	7.2
			2	5.7	6.1	6.8	5.4	7.4	6.8
			3	5.4	4.2	6.5	5.4	5.0	7.6

Table 15 Summary statistical analysis of viability each chemical by 3rd phase study

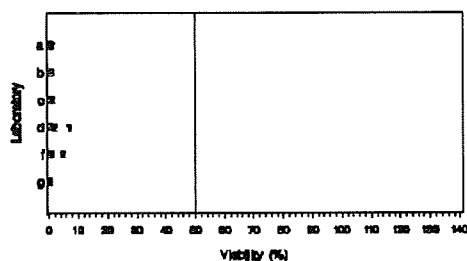
Chem.	Stat.	Lab.					
		a	b	c	d	f	g
A	Mean	13.8	11.0	16.0	12.3	12.3	12.2
	Median	14.0	11.1	13.2	13.2	11.4	13.7
	Min	13.3	10.2	12.3	9.9	11.3	8.7
	Max	14.2	11.8	22.5	13.8	14.3	14.3
B	Mean	2.0	2.3	2.8	3.6	2.5	4.1
	Median	1.5	2.2	2.9	3.9	2.6	3.9
	Min	1.5	2.2	2.5	3.0	1.7	3.7
	Max	3.1	2.5	3.0	4.0	3.2	4.7
C	Mean	0.8	0.8	1.0	3.2	2.2	0.6
	Median	0.7	0.8	1.0	2.0	1.0	0.4
	Min	0.5	0.7	0.7	0.8	0.8	0.3
	Max	1.3	1.1	1.4	6.9	4.8	1.0
D	Mean	15.6	18.5	12.6	17.2	13.9	16.2
	Median	14.5	16.0	12.6	18.3	13.8	15.2
	Min	13.6	15.5	12.5	10.3	8.8	14.1
	Max	18.6	24.0	12.7	23.0	19.2	19.3
E	Mean	3.4	3.2	3.4	5.3	4.2	4.1
	Median	3.9	3.4	3.4	3.9	4.2	4.1
	Min	1.8	2.7	3.3	3.7	3.2	3.4
	Max	4.5	3.5	3.5	8.2	5.0	5.1
F	Mean	5.5	5.8	6.6	5.7	5.9	7.2
	Median	5.6	6.1	6.5	5.4	5.2	7.2
	Min	5.4	4.2	6.5	5.4	5.0	6.8
	Max	5.7	7.2	6.8	6.4	7.4	7.6



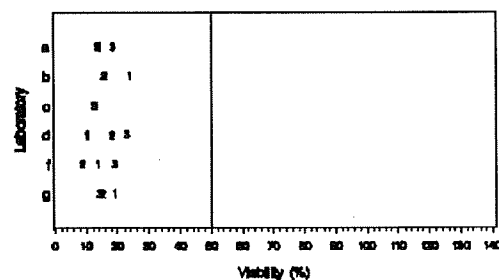
2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine HCl



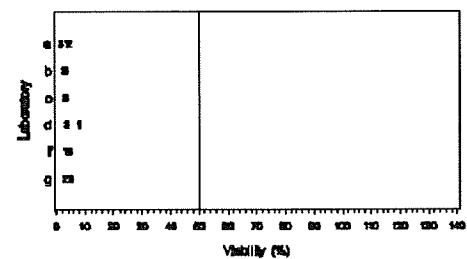
cinnamaldehyde



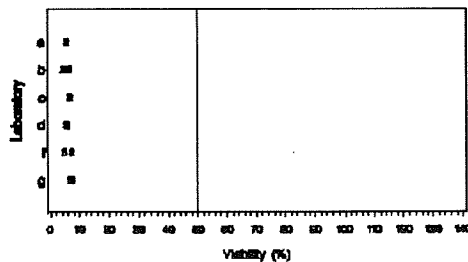
potassium hydroxide (5% aq.)



benzathine, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl



1-methyl-3-phenyl-1-piperazine



1,1-bichloroethane

Fig.5 Distribution of viability each chemical

8-2-5. IL-1 α

The results of the LabCyte EPI-MODEL 24 skin irritation test when IL-1 α was evaluated as an indicator are summarized in Table 16.

Table 16. IL-1 α levels from each laboratory.

Chem.	GHS	Score	Exp.	Lab.						
				a	b	c	d	e	f	g
01	no	0	1
			2
			3
02	no	0	1	132.8	52.9	59.3	41.2	60.7	61.3	9.4
			2	68.1	56.5	37	89.1	68.4	99.3	9.6
			3	97.6	41.1	76	72.4	46	70.1	12.6
03	no	0	1	12	9.5	15.5	8.6	23.2	12.7	8.1
			2	7.1	8.6	11.7	19.9	10.5	9.2	11.9
			3	10.7	10.3	12.9	9.4	11.3	6.7	15.7
04	no	0	1	10	6	8	11.7	9.5	2.5	6.3
			2	5.3	8	5.5	13.2	15.1	2.6	8.6
			3	6.3	4.7	7.2	7.9	9.7	3.4	6.8
05	no	0.3	1	122	97.6	24.3	81.2	57.7	183.5	15.4
			2	35.7	63.5	35.1	115.3	36.6	.	28.5
			3	44.4	26	31.2	49.4	33	191.6	33.2
06	no	0.3	1	59	85.7	114	85.6	94.4	60.8	112.5
			2	62.9	93.6	104.9	139.5	81.4	48.1	62.1
			3	68.8	85.1	82.9	64.5	52.9	54.8	147.1
07	no	1	1
			2
			3
08	no	1	1	8.2	9.4	84.1	4.1	6.9	21.4	5.3
			2	3.6	6.4	31.6	10.4	8.5	4.9	5.8
			3	6	4.1	33.1	5.2	6.7	2.1	7.2
09	no	1.7	1	10.9	17.1	11.2	42.6	29.5	33	7.4
			2	19.8	8.8	8.8	32.2	6.5	25.3	9.7
			3	31.3	6.8	20.1	21.3	11.2	24.7	10.6
10	no	1.7	1	27.9	7.4	31.3	41.2	46.5	39.3	9.8
			2	17.1	12.7	15	50.4	26.7	26.7	14.5
			3	66.2	12.2	30	42.1	26.3	24.2	13.2

Table 16. continued.

Chem.	GHS	Score	Exp.	Lab.						
				a	b	c	d	e	f	g
11	no	2	1	5	31.1	18	15.3	10.4	16.2	6.4
			2	3.3	11.9	15.8	19	9.7	8.1	7.5
			3	18.2	5	8.9	8.7	8.6	12.6	11.9
12	no	2	1	.	.	.	157.2	120.4	.	34.5
			2	.	.	.	113	118.6	90.2	27.3
			3	58.3	66.2	13.6
14	Category 2	2.3	1
			2
			3
15	Category 2	2.3	1
			2
			3
16	Category 2	2.7	1	86.9	68.1	129.4	.	126.8	116.5	90.8
			2	.	100.2	74.4	169.7	76.1	107.5	70.9
			3	121.2	42.5	83.6	.	73.1	87.3	79.2
17	Category 2	2.7	1
			2
			3
18	Category 2	3	1	61.5	.	60.6	90.3	86.9	114.5	18
			2	57.7	104.9	45.8	221.3	98.7	76.4	45.1
			3	.	17.2	51.4	138.1	63.9	102.2	22.1
19	Category 2	3	1	.	57.3	.	.	109.2	.	.
			2	69.2	.
			3	102.3	.	.	.	68	59.5	.
20	Category 2	4	1
			2
			3

Cells highlighted in yellow indicate that the classification changed based on the IL-1 α data.

8-2-6. Classification of three independent viabilities at each laboratory

The classifications from mean of three independent viabilities only evaluated MTT assay were shown in Table 17 in 2nd phase study and Table 19 in 3rd phase study. Refer to Table 18, the IL-1 α results changed the classification for only 3 data points. The classification of **Allyl phenoxyacetate** by Lab f was changed the misunderstood classification. The other two chemicals were changed the correct classification. Regarding the IL α only a few chemicals showed different results but the overall call was that IL α did not significantly contribute to the performance of the assay.

Table 17. Classification using three independent viabilities by 2nd phase study

「P」:Positive, 「N」: Negative

Chem.	GHS	Score	Lab.						
			a	b	c	d	e	f	g
01	no	0	P	P	P	P	P	P	P
02	no	0	N	N	N	N	N	N	N
03	no	0	N	N	N	N	N	N	N
04	no	0	N	N	N	N	N	N	N
05	no	0.3	N	N	N	N	N	N	N
06	no	0.3	N	N	N	N	N	N	N
07	no	1	P	P	P	P	P	P	P
08	no	1	N	N	N	N	N	N	N
09	no	1.7	N	N	N	N	N	N	N
10	no	1.7	N	N	N	N	N	N	N
11	no	2	N	N	N	N	N	N	N
12	no	2	P	P	P	N	N	N	N
14	Category 2	2.3	P	P	P	P	P	P	P
15	Category 2	2.3	P	P	P	P	P	P	P
16	Category 2	2.7	N	N	N	P	N	N	N
17	Category 2	2.7	P	P	P	P	P	P	P
18	Category 2	3	N	N	N	N	N	N	N
19	Category 2	3	P	P	P	P	N	N	P
20	Category 2	4	P	P	P	P	P	P	P

Table.18. Classification of chemicals by MTT assay demolished by additional IL-1 α measurement

No.	Chemical	CAS number	GHS label	In vivo score (PII)	Lab.	Classification by MTT assay	Classification by MTT+IL-1 α
05	Allyl phenoxy-acetate	7493-74-5	no	0.3	f	N	P
16	1-bromohexane	111-25-1	Category 2	2.7	a	N	P
18	di-n-propyl disulphide	629-19-6	Category 2	3	d	N	P

Table 19 Classification using three independent viabilities by 3rd phase study

「P」:Positive, 「N」: Negative

Chem.	in vivo	Score	Lab.					
			a	b	c	d	f	g
A	no	2	P	P	P	P	P	P
B	Category 2	2.7	P	P	P	P	P	P
C	Category 2	2.7	P	P	P	P	P	P
D	Category 2	3.3	P	P	P	P	P	P
E	Category 2	3.3	P	P	P	P	P	P
F	Category 2	4	P	P	P	P	P	P

Table 20. Sensitivity, specificity and accuracy on MTT assay vs GHS-EU classification in the 2nd + 3rd Phase validation study (25 substances)

Index	Lab.						
	a	b	c	d	f	g	
Sensitivity	10/12	10/12	10/12	11/12	9/12	10/12	
	83.3	83.3	83.3	91.6	75	83.3	
Spescificity	9/13	9/13	9/13	10/13	10/13	10/13	
	69.2	69.2	69.2	76.9	76.9	76.9	
Accuracy	19/25	19/25	19/25	21/25	19/25	20/25	
	76	76	76	84	76	80	

Table 21. Sensitivity, specificity and accuracy on MTT assay vs GHS-EU classification in 2nd phase study (19 substances).

Index	Lab.						
	a	b	c	d	e	f	g
Sensitivity	5/7	5/7	5/7	6/7	4/7	4/7	5/7
	71.4	71.4	71.4	85.7	57.1	57.1	71.4
Spescificity	9/12	9/12	9/12	10/12	10/12	10/12	10/12
	75	75	75	83.3	83.3	83.3	83.3
Accuracy	14/19	14/19	14/19	16/19	14/19	14/19	15/19
	73.7	73.7	73.7	84.2	73.7	73.7	78.9

Table 22. Sensitivity, specificity and accuracy of the MTT assay and IL-1 α vs. the GHS-EU classification in 2nd phase study (19 substances).

Index	Lab.						
	a	b	c	d	e	f	g
Sensitivity	6/7	5/7	5/7	7/7	4/7	4/7	5/7
	85.7	71.4	71.4	100	57.1	57.1	71.4
Spescificity	9/12	9/12	9/12	10/12	10/12	9/12	10/12
	75	75	75	83.3	83.3	75	83.3
Accuracy	15/19	14/19	14/19	17/19	14/19	13/19	15/19
	78.9	73.7	73.7	89.5	73.7	68.4	78.9

Table 23(A). Mean and range of Sensitivity, specificity and accuracy on the MTT assay using LabCyte EPI-MODEL vs. GHS-EU classification in the 2nd + 3rd Phase validation study (25 substances)

	N	Mean	Min.	Max.	ECVAM criteria
Sensitivity (%)	6	83.3	75.0	91.6	80.0
Specificity (%)	6	73.1	69.2	76.9	70.0
Accuracy (%)	6	78.0	76.0	84.0	75.0

Table 23(B). Mean and range of sensitivity, specificity and accuracy of the MTT assay vs. the GHS-EU classification in 2nd phase study (19 substances).

	N	Mean	Min.	Max.	ECVAM criteria
Sensitivity (%)	7	69.4	57.1	85.7	80.0
Specificity (%)	7	79.7	75.0	83.3	70.0
Accuracy (%)	7	75.9	73.7	84.2	75.0

Table 23(C). Mean and range of sensitivity, specificity and accuracy of the MTT assay and IL-1 α vs. the GHS-EU classification in 2nd phase study (19 substances).

	N	Mean	Min.	Max.	ECVAM criteria
Sensitivity (%)	7	73.4	57.1	100.0	80.0
Specificity (%)	7	78.6	69.2	76.9	70.0
Accuracy (%)	7	76.7	68.4	89.5	75.0

9. Discussion

9-1. Reliability

All data of negative control and positive control each laboratory in 2nd and 3rd phase study was sufficient with the acceptance criteria as shown in Tables 10 and 11. There were high respectabilities within and between laboratories in this model.

In all data, Invalid data obtained only one data (Lab a, run 1). This lab performed at retesting and we accepted data of run 2-4. Therefore, the rate of invalid at this assay is 0.2% (total 1/508, 400 data: 3runs X 7 labs X 19 chemicals+1 run in 2nd phase study & 108 data; 3 runs X 6 labs X 6 chemicals in 3rd phase study). Based on a comparison of the results from the seven laboratories, the classification of 3 chemicals (No. 12, 16 and 19) should be potentially changed. However, the classifications of the remaining chemicals were not changed. The variations of these chemicals and No.18 are larger than those of others. The IL-1 α data changed the classification for No. 5, 16 and 18 at Lab. f (No. 5), Lab. a (No. 16), and Lab. d (No. 18). The effect of IL-1 α on the reliability of these results is small .

9-2. Predictivity

In December 2008, the EU adopted the UN Globally Harmonised System for Classification and Labelling and will implement this by means of the so-called CLP regulation (Regulation EC 1272/2008). The new EU classification system based on UN GHS (abbreviated here as "GHS-EU") continues to use two categories to distinguish non-irritant (no-category) from irritant (category 2) substances. However, according to the new rules for skin irritation classification and labelling, the cut-off score to distinguish between no-category and category 2 substances was shifted to 2.3 from a value of 2.0 (EU classification system). Consequently substances with an in vivo score between 2.0 and 2.3 that are considered irritant under the existing EU classification system will be considered non-irritants under the future GHS-EU classification system, which does not use the optional UN GHS category 3.

The prediction values of the LabCyte EPI-MODEL 24 skin irritation test when it was evaluated by cell viabilities (MTT) as an indicator, and the GHS-EU classifications are shown in Table 20. The sensitivity, specificity and accuracy of this prediction model at each laboratory were 75-91.6 %, 69.2-76.9 %, and 76-84 %, respectively. These predictivities were similar with each laboratory. The mean and range of prediction values of the skin irritation test with LabCyte EPI-MODEL 24 when it was only evaluated by MTT as an indicator and the GHS-EU classification are shown in

Table 23(A). The mean sensitivity, specificity and accuracy of this prediction model are 83.3%, 73.1%, and 78.0%, respectively. Some deviations from the ESAC Performance standard (sensitivity of 80%, specificity of 70% and an accuracy of 75%) that were specific adaptations for the Japanese model.

The effect of IL-1 α on the predictivity was small compared with results in Tables 21,22, 23 (B) and 23(c).

10. Conclusions

Based on the GHS-EU classification, 12 irritants and 13 non-irritants in the ECVAM Performance Standards(2007,2009) were tested by the 7 labs using **LabCyte** EPI-MODEL. The assay demonstrated high reliability within and between laboratories, and acceptable reliability of the positive control (100%) and accuracy (77.5% overall accuracy, 82.3% overall sensitivity, 72.6% overall specificity) on the MTT assay for use as a stand-alone assay to distinguish between skin irritants and non-irritants.

This report summarized at JSAAE 1st report and 2nd report on this validation study (Appendix 7 and 8).

11. Acknowledgement

This validation study has supported by the Health and Labour Sciences Research Grant, Japan.

12. References

- ECVAM : Performance standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing (2007)
- EPISKIN®-MTT reduction
scientifically validated as replacement to the Draize skin irritation test (2007)
- ESAC statement on the validity of in-vitro tests for skin irritation (2007)
- ESAC STATEMENT ON THE SCIENTIFIC VALIDITY OF IN-VITRO TESTS FOR SKIN IRRITATION TESTING (2008)
- ESAC STATEMENT ON THE PERFORMANCE UNDER UN GHS OF THREE IN-VITRO ASSAYS FOR SKIN IRRITATION TESTING AND THE ADAPTATION OF THE REFERENCE CHEMICALS AND DEFINED ACCURACY VALUES OF THE ECVAM SKIN IRRITATION PERFORMANCE STANDARDS (2009)
- Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Part 3: Health and Environmental Hazards*, pp. 107–228. New York, NY, USA, and Geneva, Switzerland: United Nations Organisation (2003).
- Green H. (1978): Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: new view. *Cell*, 15, 801-811.
- Hartung, T., Bremer, S., Casati, S., Coecke, S., Corvi, R., Fortaner, S., Gribaldo, L., Halder, M., Hoffmann, S., Roi A.J., Prieto, P., Sabbioni, E., Scott, L., Worth, A. and Zuang, V. (2004) A Modular Approach to the ECVAM Principles on Test Validity. *ATLA* 32, 467-72.
- Masakazu Katoh, Fumiyasu Hamajima, Takahiro Ogasawara, and Ken-ichiro Hata (2009) Assessment of the Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to the ECVAM-Validated Protocol, *Journal of Toxicological Science*, 34(3) 327-334.
- OECD (1999) *OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring No 5, Compliance of Laboratory Suppliers with GLP Principles*. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development.
- OECD (2002) *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 404: Acute Skin Irritation/Corrosion*. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development.
- OECD (2005) Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34. Available at: http://www.oecd.org/document/30/0,3343,en_2649_34377_1916638_1_1_1,00.html. Accessed on 12.02.2008.
- REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006)
- Rheinwald J.G. and Green H. (1975): Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, 6, 331-344

4) 皮膚感作性試験 LLNA-DA 法の第三者評価

研究要旨

ダイセル化学工業（株）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-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。

A. 研究目的

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-DA 法の専門家による第三者評価を目的とした。

B. 方法

B-1) 評価委員

委員長*

田中憲穂 (食品薬品安全センター 秦野研究所 遺伝毒性部)

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 (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 (サノフィ・アベンティス株式会社 統計解析室)

筒井尚久 (三菱ウェルファーマ株式会社 創薬研究本部 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、品質保証センター)

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) 経緯と方法

ダイセル化学工業（株）から提案のあった皮膚感作性試験 LLNA の放射性同位元素 (RI) 標識化合物を用いない代替法 (LLNA-DA 法) について、平成 17 年度の厚生労働科学研究班で一次評価が行われ

た。評価委員会は、本試験法の原法である 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、比較的短時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のばらつきについての情報を得る必要があった。そのため、多施設バリデーションの実施を日本動物実験代替法学会 (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 (バリデーション実行委員会) により 14 物質を用いた、17 施設でのバリデーション (第 1 実験: 10 施設、第 2 実験: 7 施設) が実施され、その報告を受けた評価委員会は二次評価を行った。

C. 結果および考察

本試験法の Stimulation Index (SI) 値および感作性の有無における施設間再現性はおおむね良好であった。なお、被験物質の媒体への溶解状態に差がある場合は結果の再現性に影響する可能性が指摘された。また、第 1 実験における 12 被験物質による LLNA 法との対応性の検討結果は感度 87.5%、特異度 75%、正確性 83.3% と良い結果が得られた。第 2 実験の 5 被験物質については Cobalt chloride で施設間のばらつきにより感作性の有無の判定ができなかったが、他の 4 物質の判定は LLNA 法のものとは一致した。

これらと申請者の自家試験結果を合わせて全 33 物質で評価した結果、感度、特異性、正確性はいずれも 90% 以上であり、LLNA-DA 法は LLNA 法の代替として有用であるとの結論が得られた。

D. 結論

申請者の提出資料に基づく情報および代替法学会で実施され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。

E. 資料

資料 4-1 ダイセル化学工業（株）より提案のあつ

た皮膚感作性試験代替法（LLNA-DA 法）の一次評価
報告書
資料 4-2 皮膚感作性試験代替法（LLNA-DA 法）の

二次評価報告書

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

日本動物実験代替法学会 評価委員会

委員長*

田中憲穂（食品薬品安全センター 秦野研究所）
大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター 薬理部）

副委員長

金澤由基子（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 療品部）
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）
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（ヤンセンファーマ（株）研究開発本部データ管理部）

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3月31日現在）

*: 2004年12月まで田中憲穂が、その後は大野泰雄が委員長を勤めた。

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

要旨

平成15年度の厚生科学研究班の決定により、ダイセル化学工業（株）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-DA 法) を評価した。評価委員会では感作性試験評価ワーキンググループ (WG) を組織した。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、短時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ばらつき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

医薬品等の皮膚感作性は主にモルモットを用いた Maximization 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、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 ^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 BrdU の取り込みをみる方法 (Takeyoshi et al 2003) も報告されているが、未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) に評価を依頼するため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 年度より検討を行った。なお、本試験法については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、評価委員会で検討したのち、適切と判断された場合には施設間バリデーションを行うように勧告し、その結果を待って、再度評価することになる。

B. 評価方法

B-1) 評価組織

従来の評価委員会は光毒性試験代替法の評価のために組織されたものであり、必ずしも感作性試験代替法の評価に相当では無かった。そこで、これとは別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を組織した。また、オブザーバーとして、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

田中憲穂 (食品薬品安全センター秦野研究所) 2004 年 12 月まで

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所・薬理部) 2005 年 1 月より

副委員長

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所・薬理部 2005 年 12 月まで)

金澤由基子 (食品薬品安全センター秦野研究所・毒性部 2005 年 1 月より)

委員

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所・療品部)

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 創業本部 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

提案者はダイセル化学工業 (株) 総合研究所 評価・解析センター 山下邦彦、出原賢治

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等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るべきとされた。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、既に論文等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、ダイセル化学工業 (株) より提供を受けた資料、生データおよび集計データに基づいて評価した。な

お、ダイセル化学工業（株）から申請時に提供された資料は以下のとおり。

代替試験法申請書類、皮膚感作性試験：LLNA-DA 法、ダイセル化学工業（株）評価解析センター

資料 1) 代替しようとする試験法の名称および代替法の名称

資料 2) LLNA に関する資料

資料 3) LLNA-DA の原理

資料 4) LLNA-DA のプロトコール

資料 5) LLNA-DA で評価した被験物質リスト

資料 6) LLNA-DA 試験結果

資料 7) LLNA-DA の感度、特異性、予測性、一致率及びその他の特徴

資料 8) LLNA-DA の特徴

資料 9) その他、データ解析上有用な資料（生データ等）

資料 8) 論文（または、学会発表資料&印刷中の論文原稿）

添付資料 8-1) 出原賢治、山下邦彦、福田徳雄、山岸学、河田直紀、非-RI LLNA 試験法の検討、第 17 回日本動物実験代替法学会発表資料 (2003. 11. 7)

添付資料 8-2) 出原賢治、山下邦彦、福田徳雄、山岸学、河田直紀、非-RI LLNA を用いた新規な化学物質の皮膚感作性評価、第 17 回日本動物実験代替法学会発表資料 (2003. 11. 7)

添付資料 8-3) 非-RI LLNA 法の検討とリスクアセスメントへの応用、第 10 回日本免疫毒性学会学術大会発表資料 (2003. 9. 25)

添付資料 8-4) 非 RI LLNA 法による皮膚感作性試験方法の検討と応用、第 76 回日本産業衛生学会発表資料 (2003. 4. 23)

添付資料 8-5) Yamashita K. et al, Development of modified local lymph node assay using measure as an endpoint, Alternatives to Animal Testing and Experimentation (投稿中)

資料 9) OECD guideline for the testing of chemicals 429, Skin sensitization: Local lymph node assay (adopted 24th April, 2002)

資料 10) 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、以下の文書を参考資料として用いた。

- 1) ICCVAM, The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). February 1999.
- 2) OECD, Draft guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment (3rd version), 25 January 2005.

会議の記録、および申請後に提出された主な文書は以下のとおり。

- 1) 第一回 LLNA-DA 評価会議 (2004. 7. 20) 議事録
- 2) LLNA 評価ワーキンググループ、LLNA-DA 法についてのダイセルへの質問 (2004. 8. 14)
- 3) 出原賢治、山下邦彦、第 1 回評価委員会でのご質問に対する回答 (040917)
- 4) 第二回 LLNA-DA 評価委員会 (2004. 10. 15) 議事録
- 5) 第三回 LLNA-DA 評価委員会 (2005. 1. 25) 議事録
- 6) 出原賢治、山下邦彦、リンパ球サブクラスの解析結果報告 (2004. 12. 26)
- 7) LLNA 評価ワーキンググループ、リンパ球サブクラスへの影響の検討実験についてのコメント (2005. 1. 25)

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、光毒性試験代替法を評価したときの経験を基に事務局が作成した評価の要点（ダイセルより提案された皮膚感作性試験代替法 (LLNA-DA 法) の評価委員会での評価について）を参考に、申請者により提出された申請内容を評価した。委員より出された疑問点について申請者に問い合わせ、その回答を踏まえ一次評価を行った。なお、今回の申請では多施設によるバリデーション結果は添付されていないことから、最終評価は行えなかった。一次評価の結果多施設で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等が若干修飾される可能性があるが、その際は申請者の意向を尊重することとした。

評価委員会では平成16年度において3回の会議を開催し、ダイセルより提供された申請資料を評価した。その結果はB-3)項に記載した議事録にまとめた。

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³H-Methyl thymidine または ¹²⁵I-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、溶媒対照群の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、従来の方法と比べ、以下のようないメリットがある。

- 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, OHSa も受け入れている。

しかし、リンパ節の細胞増殖反応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産生を見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い。

C-2) 申請法について

C-2-1) LLNA-DA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)による抗原特異的なT-リンパ球の増殖を、耳介リンパ節を標的臓器とし、そのリンパ節におけるRI標識化合物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-DA法は細胞増殖を検出する指標をATPの検出に変更したものであり、基本的な原理にLLNA法と変わるところは無い

なお、LLNA-DA法はLLNAと同等の検出感度を得るために投与操作および日程に変更を加えている。この変更により感作誘導における原理が両者で異なるか否かについては評価委員会にて特に審議した点であり、C-4)に詳述する。

C-2-2) LLNA-DA法のプロトコール

LLNA-DA法のプロトコールを以下に要約する。なお、参考のため、LLNA法の内容を括弧の中に示した。

使用動物：出産経験の無い雌CBN/JN系マウス (同様の雌CBA/CaまたはCBA/J系マウス)

なお、CBA/JNマウスとは、日本チャールズリバーより購入したCBA/INCrjマウスであり、CBA/Jと基本的に同等のマウスである。

投与群設定：溶媒を用いる陰性対照、陽性対照(10% Eugenol, または15% Hexyl cinnamic aldehyde)、および

び3用量以上の被験物質（同左、OECDは陽性対照としてHexyl cinnamic aldehydeとMercaptobenzothiazoleを推奨）

群あたり動物数：1群あたり3匹以上（4匹以上）

なお、マウスは群飼いとしたが、処置部を他のマウスが傷害したり、被験物質をなめ合うことことは観察されておらず、群飼いが感作性に影響するといった問題は今のところ認識されていない。

溶媒：被験物質が最も良く溶け、あるいは懸濁できる溶媒を用いる。通常Acetone/Olive oil (4:1, A00), Dimethylformamide (DMF), Methyl ethyl ketone (MEK), Propylene glycol (PG), Dimethylformamide (DMSO)の順に選択する。(同左)

測定指標：ルシフェリン・ルシフェラーゼ法による耳介リンパ節のATP含量（³H-Methyl-thymidineまたは¹²⁵I-Deoxyuridineを静脈注射し、リンパ球に取り込まれた放射活性）

試験操作：LLNA-DA法では3日間連続で1% SDS処置1時間後に被験物質溶液あるいは懸濁液をマウスの両耳介に塗布する。7日目（または6日目）に4回目の塗布を行い、その24時間後に両耳介リンパ節を取り出し、個体毎に重量を測定したのち、2枚のスライドグラスにはさんで押しつぶす。それを0.5mLのPBS中に入れ、洗い流す。これを攪拌し、膜組織を避けて20μLサンプリングし、PBS 1.98mL中に加え、ATP測定試料とする。

4回目の塗布により、対照群と処置群との測定値の比(SI値)は顕著に増加する。これは抗原特異的な活性型リンパ球またはメモリー細胞が形成され、それらの急速な増殖が生じていることが考えられる。

(被験物質を3日間連続処置した後、6日目に³H-Methyl-thymidineあるいは¹²⁵I-Deoxyuridine溶液を尾静脈から注入し、5時間後にマウスを屠殺する。リンパ節を取り出し、群毎にプールし(個別データが必要な場合は個別別にプールする)、金属性メッシュ上で穏やかに押しつぶし、細胞懸濁液を調製する。これをPBSで2回洗浄した後、5% TCA中で18時間静置した後、ペレットを1mLのTCAに懸濁し、リンパ球増殖活性をRIの取り込み量を指標として評価する。)

即ち、LLNA-DA法では4回目の処置を行うことがLLNA法と大きく異なっている。

結果の判定：SI値が3以上の時に、感作性陽性とする。(同左)

C-2-3) LLNA-DA法の特徴

LLNA法と比較し、LLNA-DA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³H-Methyl thymidineの取り込みを測定するが、LLNA-DA法ではRIを使用しない方法として、ATP含量の増加を指標とした。
- 2) LLNA法は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が、LLNA-DA法は3日間連続投与後、7日目（または6日目）にも4回目の投与を行い、その翌日にリンパ球増殖を測定する。
- 3) LLNA-DA法は投与の際に1% SLSの前投与を行う。
- 4) リンパ節を摘出し、スライドグラスでつぶすことにより、迅速にリンパ細胞を懸濁できる。
- 5) 10% Eugenolの作用を9回の繰り返し実験で検討したが、いずれもSI3以上の値を示し、再現性がある。
- 6) 感作性物質の識別性はLLNA法とほぼ同じである。
- 7) RI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。
- 8) ATP含量を高感度かつ迅速な測定法であるルシフェリン・ルシフェラーゼ法で測定することから、結果が速やかに定量的データとして得られる。

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-DA法のバリデーシが行われ、再現性や識別性がLLNA法とほぼ同様と評価されている。また、提案者は生産現場で多くの化学物質について実際に試し、労働安全の立場で、良い結果が得られているとのことである。しかし、いずれも一施設での結果であり、公平な評価を行う上では多施設バリデーシンの結果が必要である。

C-3) 申請者の行ったバリデーシンの結果について

C-3-1) 被験物質の妥当性

被験物質は17種類で、その内モルモット試験で陽性と判定されているものが14種類、陰性と判定されているものが3種類であった。

被験物質には、クロルベンゼン類(DNCB: 2,4-Dinitrochlorobenzene)、アミン類(pPDA: 4-Phenylenediamine)、カルボン酸(Trimellitic anhydride, Abietic acid)、アルデヒド類(cinnamic aldehyde, HCA: Hexylcinnamic aldehyde, Citral)、フェノール類(Isoeugenol, Eugenol)、Urea類(Imidazolidinyl urea)、チオール類(MBT: 2-Mercaptobenzothiazol)、金属(CoCl₂, NiSO₄)、殺菌剤(Propylparaben)、エステル(Methyl salicylate)、界面活性剤(Benzalkonium chloride)等、様々な種類の化学物質が含まれている。

た。

感作性の程度に関しては、非常に強い感作性物質である⇒DNCB, pPDA、比較的強い感作性物質として⇒Cinnamic aldehyde, Isoeugenol を、中程度の感作性物質として⇒Eugenol および、Abietic acid, Hexylcinnamic aldehyde, Citral, Benzocaine を、また、弱い感作性物質あるいは刺激性物質として⇒Propylparaben, Methyl salicylate, Benzalkonium chloride が選択されている。なお、LLNA で false negative となる NiSO₄ もリストに加えられている。

以上から、施設内バリデーションでの被験物質の選択はほぼ適切であるが、陰性物質が少なかったことが指摘された。なお、申請法が原法である LLNA 法と原理的に同じと考えた場合には小数の被験物質でも良いが、異なると判定された場合には独立した新規の感作性試験法として、より多くの被験物質で申請法の妥当性を明らかにする必要がある。

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-DA 法は LLNA と同じ結果が得られた。判定の一致率について κ 係数で比較すると LLNA-DA 法と LLNA 法は 0.667、LLNA-DA 法と GPMT/BA は 0.463、LLNA-DA 法と HMT/HPTA 法は 0.316 であった。なお、ある基準では κ 係数が 0.8 以上では非常に良い一致、0.6 以上では良い一致、0.4 以下ではあまり一致していないとされており、この基準では、LLNA 法との一致は良好であるが、モルモットやヒトでの試験法との一致はあまり良くないと判断される。陰性物質が少なかった事も影響していると考えられることから、今後は陰性物質も増やして追加検討する必要がある。

なお、MBT の結果が陰性であったが、Basketter ら (1992)、また、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。しかし、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 を超えていなかった。それ以上の濃度では逆に SI 値が低下している。LLNA 法と比べ、SI 値が低くなる理由は今のところ不明である。また、LLNA 法と同様に金属塩の検出感度は良くない。

界面活性剤 Benzalkonium chloride は LLNA で陰性、LLNA-DA 法で偽陽性を示した。このため、界面活性剤の中に LLNA-DA 法で偽陽性を示す物質が存在する可能性が考えられた。既に刺激性を有する界面活性剤の中に LLNA 法で偽陽性を示すものが知られており、それらは LLNA-DA 法でも偽陽性となる可能性がある。今後、界面活性剤について LLNA-DA 法を用いて検討する必要があると考えられる。LLNA 法あるいは LLNA-DA 法により刺激性と感作性の識別をどのように可能とするかについては、今後の重要な課題である。

表：17 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	LLNA-DA	LLNA	GPMT/BA	HMT	HPTA
2,4-Dinitrochlorobenzene	+	+	+		
4-Phenylenediamine	+	+	+	+	+
Trimelitic anhydride	+	+	+		
Cinnamic aldehyde	+	+	+	+	+
Isoeugenol	+	+	+		+
Eugenol	+	+	+		+
Benzocaine	+	+/-	+	+/-	
Abietic acid	+	+	+		+
Hexylcinnamic aldehyde	+	+	+		
Citral	+	+	+	+	
Imidazolidinyl urea	+	+	+		+
2-Mercaptobenzothiazol	-	+	+	+	+
CoCl ₂	+	+	+	+	+
NiSO ₄	-	--	+	+	+
Propyl paraben	-	-	-	+/-	+
Methyl salicylate	-	-	-	-	
Benzalkonium chloride	+	-	-		+

LLNA: Local lymph node assay, GPMT: Guinea-pig maximization test, BA: Buehler assay, HMT: human maximization test, HPTA: human patch test allergen.

C-3-3) データの信頼性

主たる提案者は皮膚感作性試験について 1997 年より経験がある。また、申請法には技術的に特に困難と思われる所は無い。従って、技術面でデータの信頼性に関する問題は無いと考えられる。また、申請者の属す