

5) 皮膚感作性試験 LLNA-BrdU 法の第三者評価

研究要旨

(財)化学物質評価研究機構から提案のあった皮膚感作性試験 Local Lymph Node Assay (LLNA)の放射性同位元素 (RI) 標識化合物を用いない代替法である 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。LLNA-BrdU 法はバリデーション結果から、施設内再現性および施設間再現性および LLNA 法との対応性が高く、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-BrdU 法は ^3H -thymidine の取り込み量の代わりに Bromodeoxyuridine を指標として判定する方法であり、ラジオアイソトープ (RI) 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 法の専門家による第三者評価を実施した。

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)

*: 一次評価にも参加

B-2) 経緯と方法

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である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。近年、これらの点を解消する試験法とし Kimber らや Basketter ら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。しかし、この方法は ^3H で標識された Methyl-thymidine 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。そこで、RI を用いない方法としては、Bromodeoxyuridine の取り込みをみる方法 (BrdU 法) が我が国の施設で開発され、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申請された。研究班ではこれらの方法が RI を用いないという利点以外にも簡便、かつ比較的短期間で終了する方法であることから、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 17 年度より主に申請者の提出した資料に基づき一次評価を行った。その結果、これらの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 バリデーション

ン委員会はこの依頼を受けバリデーション実行委員会を組織し、バリデーションを行った。今回、LLNA-BrdU 法についての第二次バリデーションが終了し、その報告を受けたことから、評価委員会ではバリデーション報告書並びに関連して収集した情報に基づき、LLNA-BrdU 法が LLNA 法の代替法として妥当であるか否かを、更に評価することとした。

C. 結果および考察

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していた。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。本試験法の再現性は概ね良好であるが、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。

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、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 および施設 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 および 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、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。

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。

申請者は 30 物質についての自家試験結果および第 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、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やヒトでの皮膚感作性試験法結果と比較しても良好な対応を示し、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 法の代替法になり得るものと判断した。

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に委託したバリデーションの結果から、LLNA-BrdU 法は、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. 配布資料

- 資料 5-1 LLNA-BrdU 法第一次評価報告書
- 資料 5-2 LLNA-BrdU 法第二次評価報告書

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

日本動物実験代替法学会 評価委員会

委員長*

大野泰雄(国立医薬品食品衛生研究所)

副委員長

金澤由基子((財)食品薬品安全センター 秦野研究所)

委員

五十嵐良明(国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部)

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

田中憲穂((財)食品薬品安全センター 秦野研究所)

筒井尚久(三菱ウェルファーマ(株) 創薬本部 安全性研究所)

手島玲子(国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部)

萩野滋延((株)資生堂 安全性・分析センター 代替法開発プロジェクト室)

牧 栄二((財)食品農医薬品安全性評価センター)

オブザーバー

笛木 修((独)医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部)

(所属は平成17年8月31日現在)

(財)化学物質評価研究機構より提案のあった

皮膚感作性試験代替法(LLNA-BrdU法)の一次評価報告書

要旨

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

A. 目的および背景

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

B. 評価方法

B-1) 評価組織

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

評価委員会

委員長

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所)

副委員長

金澤由基子 ((財) 食品薬品安全センター 秦野研究所・毒性部)

委員

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所・環境衛生化学部)

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

筒井尚久 (三菱ウェルファーマ 創業本部 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 (財) 化学物質評価研究機構日田事業所、試験研究第二課 武吉正博博士である。

B-3) 秘密の保持と評価結果の公表について

審議結果は公開シンポジウムや研究報告書などで公開することを前提にしているが、個人の経歴に関する情報は公開せず、また、委員にも配布せず、事務局で保管し、必要に応じて口頭あるいは書面提示の上で説明するべきとされた。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、既に論文などに発表されたデータの利用は自由とされた。

B-4) 評価に使用した資料および会議資料

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

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

資料1) 代替しようとする試験法の名称

資料2) 代替しようとする *in vivo* 試験法に関する資料

資料3) 代替法の原理に関する資料

資料4) 試験法の詳細なプロトコール

資料5) 検討した被験物質のリストと化学物質としての特性に関する資料

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

資料7) 試験法の感度、特異性、予測性、精度(一致率)を記載した資料

資料8) 試験法の特徴

資料9) 試験法のバリデーションと、その QC に関する資料

資料10) その他、データ解析上有用な資料(生データなど)

資料11) 論文(または、学会発表資料&印刷中の論文原稿)

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

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

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

また、今回の評価に際し、以下の評価表が配布された。

資料14) 化学物質評価機構より提案された皮膚感作性試験代替法の評価委員会での評価について(評価項目案)

会議の記録は以下のとおりである。

第1回 LLNA-BrdU 評価会議(2005. 7. 26) 議事録

B-5) 評価の方法

評価委員会では、事前に資料を委員に配布した上で、会議を開催し、提案者より提出された申請内容を評価した。その際 LLNA-DA 法を評価した時に事務局が作成した評価項目案に基づいて行うことを事前に確認した。第一回の評価委員会では提案者から試験法についての説明を受け、委員より出された疑問点について申請者が回答したが、十分に審議する時間が無かったことから、その後、各委員より評価結果を委員長に送付し、委員長はそれをまとめ、委員に戻し、再度、e-mail を介して意見をもとめ、一次評価文書をまとめた。なお、出された疑問点については適宜提案者に問い合わせ、その回答を踏まえ一次評価を行った。

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

C. 評価結果

C-1) 代替しようとする試験法

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

Local lymph node assay (LLNA) 法は Kimber ら(1986)により提案された皮膚感作性試験であり、マウス耳介に3日間連続して被験物質を塗布し、6日目に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、媒体対照群の3倍以上の結果が得られたときに陽性と判定される。この方法は基本的に感作誘導期における反応を調べる方法で、従来のGPMT方法と比べ、以下のようなメリットがある。

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

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

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

C-2) 申請法について

C-2-1) LLNA-BrdU法の原理

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

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

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

C-2-2) LLNA-BrdU法のプロトコール

LLNA-BrdU法のプロトコールを以下に要約する。

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

なお、CBA/JNマウスは、感作性物質として知られている

-Benzoquinoneに対する応答性が免疫学実験に汎用されているBALB/cAnNおよびClosed colonyのCD-1と比較し、応答性が高いことが、提案者により確認されている。

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

用量は0.1%、1%、10%、50%などから選び、毒性や刺激性を避けた最大濃度を最大用量とする。なお、陽性対照群としては、 α -Hexylcinnamic aldehyde (HCA) や Isoeugenol、2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB) などを用いる。

群あたり動物数：1群あたり5匹以上

溶媒：一般的に使われるものはアセトン・オリーブ油混液 (v/v = 4:1、A00) であるが、他にN,N-Dimethylformamide (DMF)、Methyl ethyl ketone (MEK)、Propylene glycol (PG)、Dimethylsulfoxide (DMSO) などを使用することができる。

試験操作：

1) 感作

毎日ほぼ一定の時刻に、マウスの両耳介にマイクロピペッターなどを用いて1耳介当たり25 μL を塗布

する。感作は初日を Day 0 として Day 2 までの 3 日間連続塗布する。

2) BrdU の投与

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

3) リンパ節の採取

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

4) BrdU 取り込み量の測定

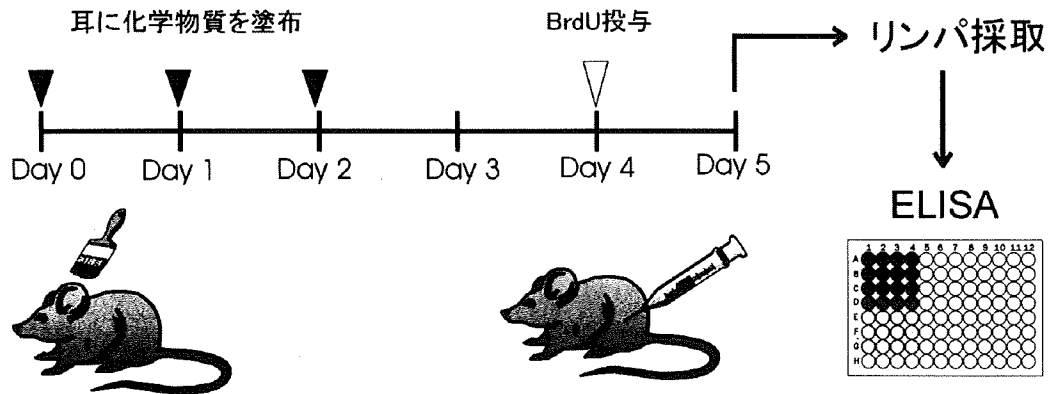
耳介リンパ節を 1 匹分毎にマイクロチューブ内で少量の生理食塩液と共にすりつぶし、ナイロンメッシュ (No. 70) で濾過した後、最終的に 15 mL の生理食塩液に分散する。この細胞分散液の 0.1 mL をマイクロプレートに移し BrdU 取り込み量の測定に供する。測定には市販の BrdU 測定キット (Roche Applied Science 社製の Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric kit, Cat. No. 11647229001) を用いる。

結果の判定:

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

実施方法の概略を図 1 に示す。

図 1 Non-RI LLNA の概略



C-2-3) LLNA-BrdU 法の特徴

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

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

果を示した。

5) RI 標識化合物を静脈内投与しないことから実験操作や廃棄物処理が容易である。

C-2-4) 提案書に記載されたバリデーシヨンの種類

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

C-3) 提案者の行ったバリデーシヨンの結果について

C-3-1) 被験物質の妥当性

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

被験物質には、クロルベンゼン類 (DNCB: 2, 4-Dinitrochlorobenzene, p-Chloroaniline)、芳香族アミン類 (pPDA: 4-Phenylenediamine, Aniline, p-Chloroaniline)、フェノール類 (Isoeugenol, Eugenol, m-Aminophenol)、キノン類 (p-Benzoquinone)、ケトン類 (Diphencyclopropenone)、アルデヒド類 (Glutaraldehyde, Cinnamic aldehyde, HCA: α -Hexylcinnamic aldehyde, Citral, 3-(4-Isopropylphenyl) isobutyraldehyde, Hydroxycitronellal)、アルコール類 (Isopropanol, Glycerol, Propylene glycol)、チオール類 (MBT: 2-Mercaptobenzothiazol)、エステル類 (Isopropyl myristate, Phthalic acid diethyl ester, Dimethylisophthalate, 2-Hydroxypropylmethacrylate)、酸化・還元剤 (p-Benzoquinone, Diphencyclopropenone) など、様々な種類の化学物質が含まれていた。しかしながら、LLNA 法で偽陰性となりやすいと思われる金属塩類 (CoCl_2 , NiSO_4) は含まれていなかった。また、殺菌剤 (Propylparaben など)、界面活性剤 (Benzalkonium chloride など)、カルボン酸 (Trimellitic anhydride, Abietic acid など)、Urea 類 (Imidazolidinyl urea など) も含まれていなかった。

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

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

C-3-2) *In vivo* データとの対応性

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

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

表：23 検体の判定結果のまとめおよび他の試験結果との比較

物質名	感作性 強度	LLNA	LLNA -BrdU 95% CI	LLNA -BrdU 3SD	LLNA -BrdU SI 3	LLNA -BrdU SI 2	LLNA -DA
2, 4-Dinitrochlorobenzene	+++	+	+	+	+	+	+
p-Benzoquinone	+++	+	+	+	+	+	
Diphencyclopropenone	+++	+	+	+	+	+	

Glutaraldehyde	+++	+	+	+	+	+	+
4-Phenylenediamine	+++	+	+	+	+	+	+
2-Mercaptobenzothiazole	++	+	+	+	-	-	-
Cinnamic aldehyde	++	+	+	+	+	+	+
Isoeugenol	++	+	+	+	-	+	+
m-Aminophenol	++	+	+	+	+	+	
3-(4-Isopropylphenyl) isobutyraldehyde	+	+	+	+	-	-	
Citral	+	+	+	+	+	+	+
Eugenol	+	+	+	+	+	+	+
Hydroxycitronellal	+	+	+	-	-	-	
α -Hexylcinnamic aldehyde	+	+	+	+	+	+	+
Isopropylmyristate	+/-	+	+	+	+	+	
2-Hydroxypropylmethacrylate	-	-	-	-	-	-	
Aniline	-	-	+	-	-	-	
Glycerol	-	-	+	-	-	-	
Isopropanol	-	-	-	-	-	-	
p-Chloroaniline	-	-	+	+	-	+	
Phthalic acid diethyl ester	-	-	-	-	-	-	
Propylene glycol	-	-	-	-	-	-	
Dimethyl isophthalate	-	-	+	-	-	-	-

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

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

C-3-3) データの信頼性

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

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

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

C-3-4) 施設内再現性

LLNA 法の再現性に関し、Basketter ら (2004) はヒトに対して中等度の感作性を有する Isoeugenol を 0.5, 1.0, 5% の用量で LLNA 実験を 29 回繰り返したデータを報告している。それによると、0.5% における SI 値の最小値は 0.7、最大値は 2.3、変動係数は 28%、1% における SI 値の最小値は 1.00、最大値は 6.3、変動係数は 53%、5% における SI 値の最小値は 4.9、最大値は 31.0、変動係数は 49% であった。また、Dearman らはヒトにおいて軽度の感作性を有する α -Hexylcinnamic aldehyde (HCA) を 2.5, 5, 10, 25, 50% の用量で 5 回繰り返したデータを報告している。それによると 2.5% における SI 値の最小値は 1.02、最大値は 2.23、変動係数は 28%、5% における SI 値の最小値は 1.36、最大値は 3.19、変動係数は 30%、10% における SI 値の最小値は 1.97、最大値は 7.07、変動係数は 57%、25% における SI 値の最小値は 7.15%、最大値は 13.88%、変動係数は 30%、50% における SI 値の最小値は 11.63%、最大値は 17.58%、変動係数は 15% であった。

LLNA-BrdU 法の再現性については、提案者は陽性対照物質である 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)、Isoeugenol、 α -Hexylcinnamic aldehyde (HCA) の 3 物質の繰り返し実験を行った。DNCB では 3 回繰り返し実験の結果、いずれも SI 値は 3 を上回り、陰性対照群の SI 値+3SD を基準とした判定で全て陽性と判定された。

なお、3回繰り返し実験の平均SI値は15.2であり、その変動係数は16.8%であった。Isoeugenolでは3回繰り返し実験の結果、いずれもSI値は3を上回り、陰性対照群のSI値+3SDを基準とした判定で全て陽性と判定された。なお、3回繰り返し実験の平均SI値は8.02であり、その変動係数は28.0%であった。HCAでは媒体としてAcetone/olive oil (A00) またはMethylethylketone (MEK) の2種類の媒体を用いてそれぞれ5回繰り返し実験を行った。その結果、いずれの媒体を用いた場合もSI値は3を上回り、陰性対照群のSI値+3SDを基準とした判定で全て陽性と判定された。なお、5回繰り返し実験の平均SI値はA00で6.10、MEK6.21であり、変動係数はA00の場合36.6%、MEKの場合で33.9%であった。

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

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

C-3-5) 施設間再現性

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

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

C-3-6) 比較対照とした *in vivo* データの妥当性

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

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

C-3-7) 試験法の頑健性

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

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

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

C-3-8) 動物福祉面からの妥当性

LLNA-BrdU 法は *in vivo* 試験法であり、完全な代替試験法ではない。しかし、LLNA 法と同様に FCA 処置を行わず、また感作成立後に抗原を投与し、抗原・抗体反応を惹起させるステップが無いことから、GPMT などの他の感作性試験と比較して動物に与えるストレスが少ない。使用動物数は LLNA 法が 1 群 5 匹以上（個体別のデータを取得する場合）であるが、LLNA-BrdU 法も同様に 1 群 5 匹以上である。GPMT 法も医薬品毒性試験法ガイドラインにおいて 1 群 5 匹以上が要求されている。これらのことから、LLNA-BrdU 法は LLNA 法と同等であり、GPMT よりも優れているところがあると考えられる。

C-3-9) LLNA-DA 法との比較

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

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

C-3-10) コストからの妥当性

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

C-3-11) その他の面からの考察

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

LLNA-DA 法と比較すると操作に時間がかかると思われる。

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

試験はかならず、休日出勤が必要となる。

C-3-12) その他申請者への質問事項

- 1) 他施設の実験成績のところで、富士フィルムの媒体は具体的に何かを、可能なら、示してもらいたい。
- 2) p-Chloroaniline の 50%A00 溶液をマウスの耳に塗布した時、皮膚刺激反応は認められたかどうかを示してもらいたい。すなわち、用量反応関係がないのは皮膚刺激によるものか否かを確認させていただきたい。
- 3) LLNA-BrdU 法の将来的な普及という観点で、「0、1、2 日に感作処置を行い、4 または 5 日に BrdU を投与し、5 または 6 日目にリンパ節を採取」という方法にできないかという意見に対して、可能であれば、この方法の採用に関する可否を科学的に示していただきたい。（休日出勤をしないですむなら、その方が望ましいということがある）

C-4) 評価委員会で特に審議した点

C-4-1) LLNA-BrdU 法開発コンセプトの妥当性について

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

C-4-2) 被験物質の適用範囲の妥当性について

本法が適用できる被験物質の範囲については LLNA 法と同様と考えられた。

C-4-3) 試験法についてのプロトコールの記載について

試験法自体は LLNA 法と比べて複雑なものではなく、申請されたプロトコールで概ね理解可能であると考えられた。BrdU 測定は通常の市販測定キットを使用することから、問題はないと考えられる一方で、ばらつき（測定値への影響）を懸念する指摘も認められた判定基準については当初のものから評価委員会の意見に基づいて修正された。

操作手順の細部に関し、以下の指摘があった。

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

C-4-4) 必要な機器、器具、器材についてのプロトコールの記載について

以下のような指摘があった。

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

C-4-5) 被験物質の用量について

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

C-4-6) LLNA-BrdU 法のプロトコールの問題点について

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

1) 判定基準について

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

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

対照群でのデータのバラツキ

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

メモ

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

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

対照群の ELISA の値の最高値と最低値の間で 9.4 倍の差があった。

LLNA原法と同じSI値を指標に取り入れ、感度が低いことを考慮してSI値1.5を判定基準とする案についても検討したが、媒体対照を用いた試験群内の動物間のばらつきを見ると、上の表に示したようにSI値が1.5程度の差が頻繁に認められていることもあり、SI値単独での基準設定は困難であるように思えた。このような判定

基準についての問題に対し評価委員会は統計学的有意差が認められ、しかもSIがある一定の基準値を超える場合を陽性とするような組み合わせによる判定基準の設定へ改良案を提示した。下の表は提案者がこの考え方に基づいて、判定した結果を示したものである。これによれば、 $SI \geq 1.5$ という条件をつけ、さらに対照群との統計的有意差がある場合、およびSIが3SD以上であるとした場合、いずれも偽陰性率は6.7%であり、カッパ係数は0.808と最も大きい値を示した。一方、 $SI \geq 2.0$ という条件をつけた場合は、False negativeが20.0%と大きくなった。

SI ≥ 1.5 であること各種エンドポイントを組み合わせた場合の識別性

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

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

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

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

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

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

SI ≥ 2 であること各種エンドポイントを組み合わせた場合の識別性

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

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

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

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

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

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

2) 動物福祉面からの妥当性について

使用動物数はLLNA原法が1群5匹以上(個体別のデータを取得する場合)であるが、LLNA-BrdU法も同様

に1群5匹以上である。群数は3段階以上としており、これも原法と同様である。

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

3) 対照物質について

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

4) 媒体について

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

5) ELISA を用いる方法の優位性について

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

6) 感作性強度の分類基準について

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

7) 刺激性物質と感作性物質の識別について

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

C- 5) 特許の状況

今回のプロトコールについては、特許出願されていない。

D. 現時点での総合評価

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

E. 今後行われる多施設バリデーションのあり方について

以下のように考えられた。

- 1) 評価委員の質問に適切な回答が行われた。この回答に沿ってプロトコールや判定基準が適正に変更されることを条件に、多施設バリデーションへの移行は問題ないとする。
- 2) 申請法は原理的に既に OECD で承認された LLNA 法とほとんど変わらないことから、バリデーションにおいては、LLNA 法との類似性を示すための簡易バリデーションが良いと思われる。
- 3) Core laboratory は化学物質評価研究機構に務めてもらい、プロトコールを作成してもらおう。また、技術トランスファーを実施してもらおう。

- 4) すでに技術移管の完了している4施設を中心に新規施設を2~3施設加えて、実施してみてもどうかという案がある。
- 5) バリデーションを行う施設はLLNA法の試験経験またはLLNA変法の研究経験を有する施設が良いと思う。
- 6) 評価方法として対照物質を用いる方法(相対的評価)をうまく取り入れた方が吸光度の数値を用いる場合よりも多施設バリデーションに向いているのではないかという意見を含め、検討する。
- 7) 試験期間を1ヶ月程度としたとき、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。

F. 引用文献

- Basketter DA, Scholes EW (1992) Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. *Fd Chem. Toxicol.* 30, 65-69.
- Basketter DA, Gerberick GF, Kimber I, Loveless SE (1996) The local lymph node assay: a viable alternative to currently accepted skin sensitization tests. *Food Chem Toxicol.* 34, 985-97.
- Basketter DA, Evans P, Gerberick GF, Kimber I A (2002) Factors affecting thresholds in allergic contact dermatitis: safety and regulatory considerations. *Contact Dermatitis* 47, 1-6.
- Basketter DA, Cadby P. (2004) Reproducible prediction of contact allergenic potency using the local lymph node assay. *Contact Dermatitis.* 50, 15-7.
- De Jong WH, Tentij M, Spiekstra SW, Vandebriel RJ, Van Loveren H (2002) Determination of the sensitising activity of the rubber contact sensitizers TMTD, ZDMC, MBT and DEA in a modified local lymph node assay and the effect of sodium dodecyl sulfate pretreatment on local lymph node responses. *Toxicology*, 176, 123-134.
- Gerberick GF, Cruse LW, Miller CM, Sikorski EE, Ridder GM (1997) Selective modulation of T cell memory markers CD62L and CD44 on murine draining lymph node cells following allergen and irritant treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 146, 1-10, 1997.
- Gerberick GF, Ryan CA, Kern PS, Dearman RJ, Kimber I, Patlewicz GY, Basketter DA (2004) A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis*, 50, 274-288.
- Hariya T, Hatao M, Ichikawa H (1999) Development of a non-radioactive endpoint in a modified local lymph node assay. *Food Chem Toxicol.* 37, 87-93.
- Hatao M, Hariya T, Katsumura Y, Kato S (1995) A modification of the local lymph node assay for contact allergenicity screening: measurement of interleukin-2 as an alternative to radioisotope-dependent proliferation assay. *Toxicology* 98, 15-22.
- Kimber I, Mitchell JA, Griffin AC (1986) Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. *Food Chem Toxicol.* 24, 585-586.
- Kimber I, Basketter DA, Butler M, Gamer A, Garrigue JL, Gerberick GF, Newsome C, Steiling W, Vohr HW (2003) Classification of contact allergens according to potency: proposals. *Food Chem Toxicol.* 41, 1799-1809.
- OECD (1996) Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test methods; ENV/MC/CHEM/TG (96) 9.
- OECD (2002) OECD guideline 429 Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, (adopted 24th April 2002)
- Takeyoshi M, Yamasaki K, Yakabe Y, Takatsuki M, Kimber I (2001) Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicol Lett.* 119, 203-8.
- Takeyoshi M, Sawaki M, Yamasaki K, Kimber I (2003) Assessment of statistic analysis in non-radioisotopic local lymph node assay (non-RI-LLNA) with alpha-hexylcinnamic aldehyde as an example. *Toxicology* 191, 259-63.
- Takeyoshi M, Sawaki M, Yamasaki K, Kimber I (2003) Assessment of statistic analysis in non-radioisotopic local lymph node assay (non-RI-LLNA) with alpha-hexylcinnamic aldehyde as an example. *Toxicology* 191, 259-63.

- Takeyoshi M, Noda S, Yamasaki K (2004) Differences in responsiveness of mouse strain against p-benzoquinone as assessed by non-radioisotopic murine local lymph node assay. *Exp Anim.* 53, 171-3.
- Takeyoshi M, Noda S, Yamazaki S, Kakishima H, Yamasaki K, Kimber I (2004) Assessment of the skin sensitization potency of eugenol and its dimers using a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J Appl Toxicol.* 24, 77-81.
- Takeyoshi M, Iida K, Shiraishi K, Hoshuyama S (2005) Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitizing potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J Appl Toxicol.* 25, 129-134.
- 医薬品非臨床試験研究会監修(2002), 医薬品非臨床試験ガイドライン解説 2002, 薬事日報社.
- 武吉正博 (2003) Murine Local lymph node assay (LLNA) の非 RI 化の試み、日本実験動物技術者協会 九州支部会報 No. 27, pp1-5.

以上

(財)化学物質評価研究機構より提案のあった
皮膚感作性試験代替法 (LLNA-BrdU 法)の二次評価報告書

日本動物実験代替法学会 評価委員会

委員長

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所)

副委員長

萩野滋延 (株式会社資生堂 品質評価センター)

委員

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 (田辺三菱製薬株式会社 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 代謝生化学部)

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)

*: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。

(財) 化学物質評価研究機構より提案のあった
皮膚感作性試験代替法 (LLNA-BrdU 法) の二次評価報告書

要旨

平成16年度の厚生科学研究班(安全性評価のための動物実験代替法の開発および評価体制の確立に関する研究(H16-医薬-005)、主任研究者:大野泰雄)の決定により、(財)化学物質評価研究機構から提案のあった皮膚感作性試験 Local Lymph Node Assay (LLNA) の放射性同位元素(RI)標識化合物を用いない代替法(LLNA-BrdU法)の一次評価を行った。この方法は先に評価したATP含量の変化を指標とする方法(LLNA-DA法)と極めて類似していることから、評価委員会ではLLNA-DA法を評価するために組織した感作性試験評価ワーキンググループ(WG)で評価することとした。WGは申請者データに基づいて一次評価を行い、本試験法は原法であるLLNA法における³H-Methyl thymidineのDNAへの取り込みの代わりにBromodeoxyuridine (BrdU)取り込みを細胞増殖の指標にしたものであり、ほとんど同じ原理による方法であること、指標の増加率は若干原法より小さいが、ほとんど同一の識別能力を持つこと、RIを用いないこと、簡便であるといった利点があると判断した。しかし、行政試験法として評価する為には、更にデータの信頼性や施設間ばらつきについての情報を得る必要があることから、評価委員会からの指摘に対応し、実験手順書などを修正した後に、多施設バリデーションを実施するよう日本動物実験代替法学会バリデーション委員会に依頼した。同委員会は、このバリデーション研究を実施するために実行委員会(実行委員長:小島肇博士)を組織した。実行委員会では12物質(LLNA法の結果を参考に設定された3用量ずつ)を用い、9施設でバリデーションを実施した(第1実験)。しかしこの結果は、最終評価の指標となるSI値(stimulation index、被験物質群のBrdU取り込み量を溶媒対照群のBrdU取り込み量で除した数値)は施設ごとに大きくばらついていた。この原因として、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考えられた。この第1実験の結果を受けて、実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れば、SI値のばらつきを小さくすることが可能であろうと考察した。この仮説は第1実験に参加した9施設による予備実験で検証され、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が作成された。そして実行委員会は新たに10物質(LLNA法の結果を参考に設定された3用量ずつ)を用いて7施設でバリデーションを実施した(第2実験)。その結果、溶媒対照群のBrdU取込み量を示す吸光度を規定した0.1~0.2の範囲内に収めるという事前に決めた実験の成立基準を満たすことができる実験は全体の約6割であった。これは、事前に定めた基準が厳し過ぎたためであると考えられた。また、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ことが明らかになった。このため、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、基準を緩和し、保存後の希釈液での測定を行わず、陽性対照物質HCAの濃度50%におけるSI値が2以上を実験成立条件として、第2実験の結果を解析した。このような解析ではSI値の濃度依存性はごく一部を除いて認められ、概ね施設間差は小さく、LLNA法との対応は良好であった。

申請者の自家試験結果を合わせて全30物質で評価した結果、本法の感度(83%)、特異性(92%)、陽性予測度(94%)、陰性予測度(79%)、一致度(87%)はいずれも高く、LLNA-BrdU法はLLNA法の代替として有用