

**Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA (LLNA: BrdU-ELISA、
局所リンパ節試験: BrdU-ELISA)の概要およびその調査結果**

平成 24 年 6 月 25 日

JaCVAM 皮膚感作性試験第三者評価委員会

委員長 金澤 由基子 [(独) 医薬品医療機器総合機構]

委員 牧 栄二 [前 (財) 食品農医薬品安全性評価センター]

要旨

マウスにおける Local Lymph Node Assay (LLNA, 局所リンパ節試験)は、感作に基づく耳介リンパ節の細胞増殖反応を放射性物質の ^3H -methyl]-thymidine (^3H -TdR) の取り込み量を測定することで定量的かつ客観的に判定する試験法である。LLNA: BrdU-ELISA は、放射性物質の ^3H -TdR の代わりに、bromodeoxyuridine (BrdU)の取り込み量を酵素免疫測定法により吸光度として測定し、細胞増殖の指標にしたものであり、原法の LLNA と同じ原理による試験法である。本試験法の原理並び簡便性は、海外においても認められるところであるが、被験物質の皮膚感作性陽性を判断するカットオフ値 [溶媒処置群(陰性対照群)に対する被験物質処置群の BrdU の取込量の比(Stimulation index、SI 値)] に本邦と海外において違いが生じている。

本報告では、JaCVAM で実施された LLNA:BrdU-ELISA の検証報告 (2008) と ICCVAM の LLNA : BrdU-ELISA Evaluation Report (2010) を対比し、両者のカットオフ値 (SI 値) の違いについて調査を行った。その結果、ICCVAM が検証の対象とした皮膚感作性陽性 32 物質全てを陽性と判定するカットオフ値 1.6 を判定基準として採用することが妥当であると考えた。また、LLNA : BrdU-ELISA に関する OECD ガイドライン (2010) においても、皮膚感作性陽性を示すカットオフ値として 1.6 が設定されている。このような状況を踏まえると、本邦においても 1.6 をカットオフ値として設定することが妥当であると考えられる。一方、SI 値が 1.6 から 2 の間には、皮膚感作性偽陽性を示す化合物も存在するため、化合物の皮膚感作性の最終判定においては、ICCVAM が勧告する付加的な情報 (例えば、用量反応情報、全身毒性若しくは過剰な局所皮膚刺激の証拠、必要に応じて、処置群と溶媒対照群の統計的な比較、ペプチド反応性、分子量、関連物質の結果、他の試験データ) を考慮して決定する必要がある。

はじめに

マウスにおける Local Lymph Node Assay (LLNA, 局所リンパ節試験)は、皮膚外用剤として用いる医薬品ならびに化粧品原料を含む化学物質等の皮膚接触感作性のリスクを動物で予測するモルモットにおける Maximization Test (GPMT)或いは Buehler Test (BT)の代替試験法であり、その予測率は、GPMT に劣らないとされ¹⁾、国際的に認知されている。LLNA は、感作に基づく耳介リンパ節の細胞増殖反応を放射性物質の ^3H -methyl]-thymidine (^3H -TdR) の取り込み量を測定することで定量的かつ客観的に判定する試験法である。LLNA: BrdU-ELISA は、放射性物質の ^3H -TdR の代わりに、bromodeoxyuridine (BrdU)の取り込み量を酵素免疫測定法により吸光度として測定し、細胞増殖の指標にしたものであり、原法の LLNA と同じ原理による試験法である。本試験法の原理並び簡便性は、海外においても認められるところであるが、被験物質の皮膚感作性のカットオフ値 [溶媒処置群(陰性対照群)に対する被験物質処置群の BrdU の取込量の比

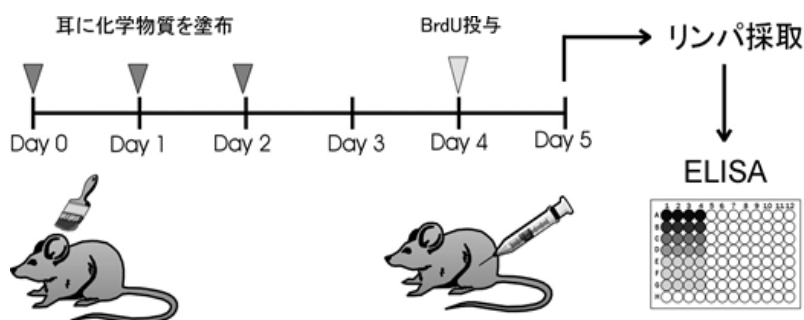
(Stimulation index, SI 値) に本邦と海外において違いが生じている。

本報告では、JaCVAM で実施された LLNA: BrdU-ELISA の検証報告(2011)²⁾と ICCVAM の LLNA: BrdU-ELISA Evaluation Report (2010)³⁾を対比し、両者のカットオフ値の違いについて調査を行ったので、その結果並びに JaCVAM 皮膚感作性試験第三者評価委員会(以下、委員会)としての提案を述べる。

1. 試験法

LLNA: BrdU-ELISA (図1) の試験法の原理は、原法のLLNAと同じである。LLNA: BrdU-ELISAでは、LLNA同様に3日間連続して被験物質を耳介に経皮投与し、5日目に³H-TdR の静脈内投与の代わりにBrdUを腹腔内投与し、6日目に採取した耳介リンパ節の感作に伴う細胞増殖を検出する。即ち、皮膚感作性を有する低分子化合物が経皮投与されると、皮膚組織中のタンパク質と結合し、感作抗原として皮膚の樹状細胞に認識される。その後、樹状細胞は活性化しながら皮膚から所属リンパ節へ遊走し、抗原提示を行い、抗原特異的なTリンパ球細胞の増殖を誘導する。この一連の生体応答が感作誘導期である。LLNAでは、感作誘導期のリンパ節における抗原特異的なTリンパ球細胞の増殖を放射性物質の³H-TdRのDNAへの取り込みを指標として検出するが、LLNA: BrdU-ELISAでは、BrdUのDNAへの取込を指標とし、BrdU量をEnzyme Linked Immuno Solvent Assay (ELISA) により検出するものである。

図1 LLNA: BrdU-ELISA の概略



2. JaCVAM の LLNA: BrdU-ELISA 検証試験における SI 値

JaCVAM の行った検証試験では、7施設が参加し、10化合物 (2,4-dinitrochlorobenzene、eugenol、formaldehyde、glutaraldehyde、hexylcinnamic aldehyde、isopropanol、lactic acid、methyl salicylate、nickel sulfate、および *trans*-cinnamic aldehyde) について盲検下にて試験された。

検証試験では、3化合物 (isopropanol、2,4-dinitrochlorobenzene および hexylcinnamic aldehyde) が全施設で検証され、7化合物 (eugenol、formaldehyde、glutaraldehyde、lactic

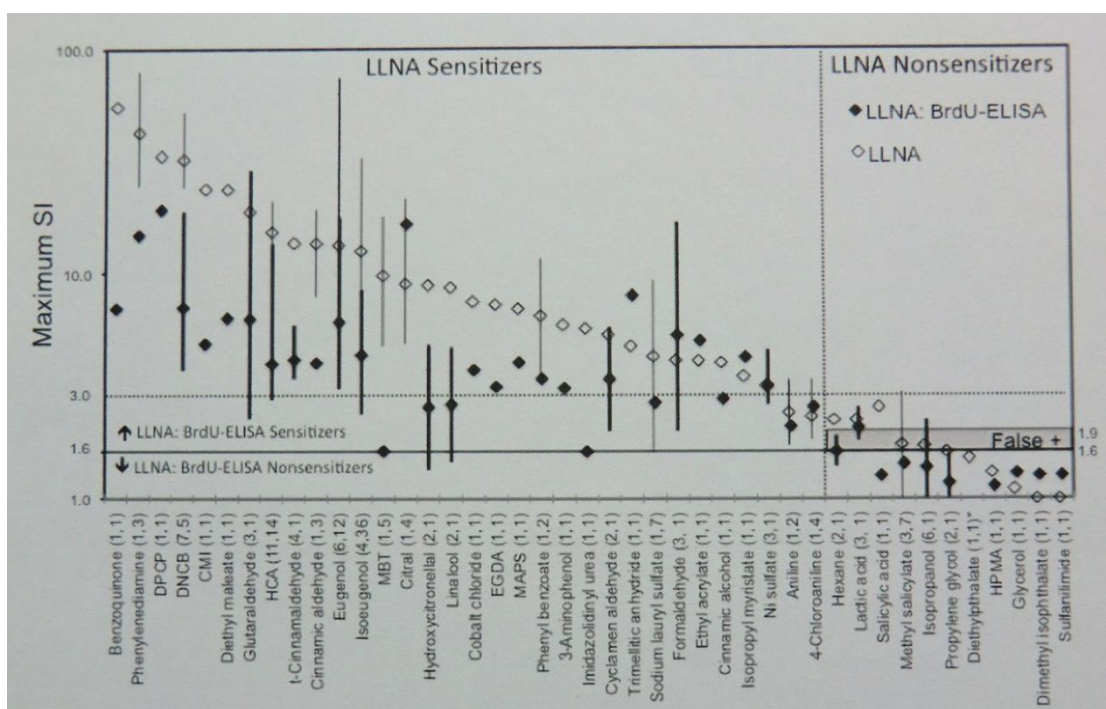
acid、methyl salicylate、nickel sulfate、および *trans*-cinnamic aldehyde) が 3 施設で検証された。試験結果は、各々の化合物処置群について抗 BrdU 抗体を用いた ELISA 法による吸光度として示され、各々の化合物処置群の SI 値が、同時に測定された溶媒対照群に対する BrdU の取込量の比として求められた。その結果、皮膚感作性陽性を示す SI 値は、 ≥ 2 と設定された。

この検討で 10 化合物について得られた結果は、それら化合物の SI 値において施設間バラツキは小さく、一貫性のあるものであった。SI 値 ≥ 2 における LLNA: BrdU-ELISA の GPMT/BT に対する感度、特異性および精度は、各々 7/7 (100%)、3/3 (100%) および 10/10 (100%) であった。

3. ICCVAM の LLNA: BrdU-ELISA Evaluation Report における SI 値 (図 2 参照)

ICCVAM は、次のように結論している。即ち、LLNA: BrdU-ELISA の精度および信頼性は、化合物を、潜在的に皮膚感作性を有する物質或いは非感作性物質として検出するためには十分であり、皮膚感作性試験として LLNA: BrdU-ELISA を支持するものである。JaCVAM の検証試験で得られた 10 化合物のデータを含む 43 化合物の検証データベースの retrospective 解析において、LLNA: BrdU-ELISA は、LLNA で皮膚感作性物質と評価された 32 化合物全て (0%[0/32]の偽陰性) と LLNA で非感作性物質と評価された 11 化合物の内 9 化合物 (18%[2/11]の偽陽性) を正確に検出した。ICCVAM は、潜在的に皮膚感作性を有する化合物を検出する判定基準としてカットオフ値 1.6 を使用することを勧告した。ICCVAM のこの勧告は、SI 値 ≥ 1.6 を使用する場合、原法の LLNA による最新の検証データベースに対して偽陰性が生じないことに基づくものである。

図 2 LLNA: BrdU-ELISA の SI 値と原法 LLNA の SI 値の比較



(化合物名の横の括弧内の数字は、LLNA: BrdU-ELISAに続いて原法のLLNAの試験数を示す。試験数は、類似の試験の最高用量のみが記載されているので、得られた試験の総数とは異なる場合がある。)

LLNA: BrdU-ELISAの欠点として、1.6から1.9の間のSI値で陽性反応が得られる場合、偽陽性の結果を生じる可能性のあることが挙げられている。ICCVAMは、この点について次のように報告している。即ち、皮膚感作性物質がLLNA: BrdU-ELISAの精度に干渉するある種の特性を持たない限り、LLNA: BrdU-ELISAの適用領域は原法のLLNAと同じ筈である。1つの例外は、nickel化合物である。原法のLLNAと異なり、LLNA: BrdU-ELISAは、それらを潜在的な皮膚感作物質として正確に同定する能力を有し、nickel化合物の皮膚感作性を評価できる。

LLNA: BrdU-ELISAの精度は、原法のLLNAの精度に匹敵するものであった。最適なLLNA: BrdU-ELISAの遂行は、皮膚感作性物質と非感作性物質を分類するためにカットオフ値1.6を使用することにより達成された。原法のLLNAと比較すると、精度は、偽陽性率18% (2/11)、偽陰性率0% (0/32)の95% (41/43)であった。LLNA: BrdU-ELISAにおいてSI値 ≥ 1.6 を使用すると、1.6から1.9の間のSI値を示す2偽陽性化合物(hexaneおよびlactic acid)が生じた。それ故、1.6から1.9の境界域のSI値を示した化合物が潜在的に皮膚感作性を有する化合物であるか否かを確認するために、他に利用できる情報、例えば、用量反応性、全身毒性あるいは過度な局所刺激性の証拠、必要に応じてSI値と共に統計的有意性を考慮すべきである。また、その考察には、既知の皮膚感作性物質との構造類似性も含め、被験物質の種々の性質をも加えるべきであるとしている。

4. ICCVAM の勧告

最終的に ICCVAM は、次のように勧告している。即ち、カットオフ値 1.6 という一つの判定基準を潜在的な皮膚感作性物質を分類するために使用すべきである、何故なら、この基準が使用されるとき、原法の LLNA による最新の検証データベースにおいて偽陰性は認められなかったからである。しかしながら、判定基準としてカットオフ値 1.6 を使用すると、原法の LLNA と比較して 18% (2/11) の偽陽性が生じる。LLNA:BrdU-ELISA において 2 偽陽性物質が 1.6 から 1.9 の間の SI 値を示したことから、この範囲での成績については、真に陽性であることを確認するために付加的な情報（例えば、用量反応情報、全身毒性若しくは過剰な局所皮膚刺激の証拠、必要に応じて処置群と溶媒対照群の統計的な比較、ペプチド反応性、分子量、関連物質の結果、他の試験データ）を考慮すべきである。

5. 委員会としての提案

表 1 ICCVAM と JaCVAM の LLNA: BrdU-ELISA の検証の比較

研究組織	LLNA: BrdU-ELISA	
	検証に使用された化合物数	陽性判定の SI 値
ICCVAM	43	≥ 1.6
JaCVAM	10	≥ 2

JaCVAM と ICCVAM の判定基準のカットオフ値の違いは、検証に使用した化合物数の違いも一因と考える。両者には検証に使用した化合物数に差があり、化合物数を多くすれば試験の精度は高まるが、皮膚感作性の判定基準であるカットオフ値は低くなることが予想される（表 1 参照）。

ICCVAM の検証において、検証の対象とされた 32 皮膚感作性物質の内 SI 値 < 2 の皮膚感作性物質は、僅か 2 化合物 (2-mercaptobenzothiazole [MBT] および imidazolidinyl urea) である。また、ICCVAM の基準である SI 値 ≥ 1.6 においては、11 非感作性物質の内偽陽性を示す 2 化合物 (hexane および lactic acid) が存在することも事実である。

以上の結果を総合的に判断し、委員会としては、ICCVAM が検証の対象とした皮膚感作性陽性物質全てを陽性と判定できるカットオフ値 1.6 を判定基準として採用することが妥当であると考え。また、LLNA: BrdU-ELISA に関する OECD ガイドライン (2010) ⁴⁾ においても、皮膚感作性陽性を示すカットオフ値として 1.6 が設定されている。このような状況を踏まえると、本邦においても 1.6 をカットオフ値として設定することが妥当であると考え。一方、SI 値 ≥ 1.6 においては、皮膚感作性偽陽性を示す化合物も存在するため、化合物の皮膚感作性の最終判定においては、ICCVAM が勧告する付加的な情報（例えば、用量反応情報、全身毒性若しくは過剰な局所皮膚刺激の証拠、必要に応じて、処置群と溶媒

対照群の統計的な比較、ペプチド反応性、分子量、関連物質の結果、他の試験データ) を考慮して決定する必要がある。

6. 文献

- 1) ICCVAM and NICEATM. 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 ICCVAM and NICEATM. NIH Publication No. 99-4494. February (1999)
- 2) Hajime Kojima, et al. Inter-laboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation. *J. Appl. Toxicol.* **31**: 63-74 (2011)
- 3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the Murine Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA, a Nonradioactive Alternative Test Method to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No. 10-7552. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences.
- 4) OECD Guideline for the Testing of Chemicals: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA (TG 442B), 22 July (2010)