

LLNA-DA 法バリデーション研究

報告書（概括）

Version 1.0

報告書作成日：2007年5月18日

報告書作成責任者：大森 崇

LLNA-DA 法バリデーション研究実行委員

委員長

大森 崇 (京都大学大学院医学研究科医療統計学分野)

委員

小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部)

寒水孝司 (大阪大学臨床工学融合研究教育センター)

吉村 功 (東京理科大学工学部経営工学科)

出原賢治 (ダイセル化学工業株式会社 評価・解析センター)

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部)

金澤由基子 (財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 医療用具試験室)

武吉正博 (財団法人 化学物質評価研究機構安全性 評価技術研究所
研究第一部)

小坂忠司 (財団法人 残留農薬研究所 毒性部)

浦谷 衛 (石原産業株式会社 中央研究所 安全科学研究室 安全性グループ)

山中 淳 (ピアス株式会社 中央研究所 ARI 評価グループ)

篠田伸介 (株式会社 薬物安全性試験センター埼玉研究所 第二毒性部)

中村洋介 (住友化学株式会社 情報電子化学業務室)

青儀 巧 (大塚製薬株式会社 徳島研究所 安全性研究センター 第2研究室)

米田知史 (トーアエイヨー株式会社 研究開発部 福島研究所)

花田智彦 (日本新薬株式会社 創薬研究所 安全性研究部)

猪田健人 (中野製薬株式会社 マーケティング本部研究)

田中正志 (明治製菓株式会社 医薬開発部門 動態安全性研究所)

有馬和範 (大正製薬株式会社 安全性研究所)

宇佐美雅仁 (ホーユー株式会社 総合研究所 基盤技術研究室)

篠田直樹 (参天製薬株式会社奈良研究開発センター)

湯浅敦子 (富士フイルム株式会社 CSR 推進部 環境・品質マネジメント部
素材試験センター)

牧 栄二 (財団法人食品農医薬品安全性評価センター)

目次

1	はじめに.....	4
2	2つの研究の要約.....	5
2.1	第1実験の要約.....	5
2.2	第2実験の要約.....	6
3.	2つの研究の評価外のLLNA-DA法の特徴.....	7
3.1	試験法の頑健性.....	7
3.2	動物福祉面について.....	7
3.3	コストについて.....	7
3.4	SOPとプロトコールに関して.....	7
3.5	評価委員による評価結果への返答としてのまとめ.....	8
4.	総括.....	8

1 はじめに

本報告書は、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会により組織された LLNA·DA 法バリデーション研究実行委員会が実施したバリデーション研究の報告書である。

ダイセル化学工業（株）は、代替法に関する厚生労働科学研究班（主任研究者 大野泰雄）に評価を依頼するため LLNA·DA 法を新しい皮膚感作性試験の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判断し、日本動物実験代替法学会評価委員会に評価を依頼した。その結果、LLNA·DA 法には複数の施設で実施されたバリデーション研究が必要とされ、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会の支援により、バリデーション研究を実施することとなった。これが本報告書で報告するバリデーション研究である。

当初、動物実験代替法学会が参加施設を公募したところ、19 の実験実施施設がバリデーション研究の参加を希望した。しかしながら、一度にこれだけの施設に動物および測定器の供給を行うことが不可能であったために、実験実施施設としての参加施設を第 1 グループと第 2 グループに分け、2 つの研究を実施することとなった。グループ分けは、LLNA 法やそれに準じた試験法を実施した経験があることや日本動物実験代替法学会の評価委員会に委員が属すること等が基準とされた。これらの基準に該当した 10 施設が第 1 グループとして、先行する研究の実施施設となった。本研究では、第 1 グループにより実施された研究を第 1 実験と呼ぶことにする。この研究の結果は「LLNA·DA 法バリデーション研究（第 1 実験）報告書」としてまとめた。残りの 9 施設については第 2 グループとして、第 1 実験の結果が得られた後に第 1 実験で生じた課題を評価することとした。第 2 グループの実験は施設による実験期間の都合により実際に実験を実施した施設は 7 施設となった。第 2 グループにより実施された研究をここでは第 2 実験と呼ぶことにする。この研究の結果は「LLNA·DA 法バリデーション研究（第 2 実験）報告書」としてまとめた。

本概括では、2 つのバリデーション研究の要約、2 つのバリデーション研究の評価外の LLNA·DA 法の特徴および総合的な結論を記載することにする。

2 2つの研究の要約

第1実験、第2実験それぞれの研究の詳細は、別に記載する報告書を参照されたい。ここでは、個々の研究の要約を示す。

2.1 第1実験の要約

【目的】 Local Lymph Node Assay (LLNA 法) はマウスのリンパ節細胞増殖反応により皮膚感作性を評価する試験法であり、モルモットを用いた試験法である Guinea-Pig Maximization Test や Buehler Test (GPMT/BT 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 量を用いる方法であり、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。第1実験では、施設間再現性と代替可能性の検討を主目的とした LLNA-DA 法の多施設バリデーション研究を実施した。

【方法】実験は、このバリデーション研究用に作成された LLNA-DA 法の standard operating procedure (SOP) に従って実施した。実験を行う前に、提案施設が主導となり技術研修会を実施した。12 被験物質のうち、3 物質は全 10 施設で、残りの 9 物質は 3 施設ごとに評価した。各被験物質をコード化し、3 用量に調製して各実験施設に送付した。判定基準は溶媒対照群の ATP 発光量に対する被験物質群の ATP 発光量の比 (stimulation index, SI 値) が 3 を超えた場合に陽性と判定した。

【結果と考察】 全施設で評価した 3 被験物質及び 3 施設で評価したその他の 5 被験物質については、施設間のばらつきは小さく、すべての施設の判定が一致した。施設間で判定が一致しなかった 4 物質中 2 物質には明らかな用量反応関係がみられたが、残りの 2 物質 (cobalt chloride と nickel sulfate) はばらつきが大きかった。この原因にはこれら被験物質の溶媒や被験物質の物性が影響している可能性があるかと推察された。GPMT/BT 法に対する LLNA-DA 法の感度、特異度、一致割合はそれぞれ 87.5% (7/8), 100% (3/3), 90.9% (10/11) であり、この結果は同じ被験物質の文献値で算出した GPMT/MT 法に対する LLNA-DA 法の感度、特異度、一致割合と同程度であった。

【結論】 本バリデーション研究で実施した 12 の被験物質の濃度範囲で得られた結果は LLNA 法と同程度であり、キャッチアップバリデーション研究として受け入れられるものであると思われる。

2.2 第2実験の要約

【目的】LLNA法やそれに類した方法を実施した経験がある10施設で12被験物質を用いて実施したバリデーション研究(第1実験)では、Acetone/Olive Oil (AOO)とAceton (ACE)を溶媒とした10の被験物質で良好な結果が得られた。しかしdimethyl sulfoxide (DMSO)を溶媒とした2つの金属塩では施設間差が大きくその原因が不明であった。そこで第2実験では、1)試験法の実施のしやすさの判定方法の構築とその評価ならびに2)金属の適用の可能性と溶媒としてDMSOを用いる被験物質の追加検討を行う目的で、7実験実施施設によるLLNA-DA法のバリデーション研究を実施した。

【方法】実験は、第1実験と同様にこのバリデーション研究用に作成されたSOPに従って実施した。実験を行う前に、提案施設が主導となり技術研修会を実施した。その際、DMSOの塗布が新たに項目として追加された。5被験物質のうち、1物質は第1実験と共通の被験物質とし、全7施設で実験を実施し、残りの4物質は4施設ごとに評価した。この4物質は溶媒にDMSOを用いるものが選ばれ、そのうち3物質が金属塩であった。各被験物質をコード化し、3用量に調製して各実験施設に送付した。判定基準は、第1実験と同様にSI値が3を超えた場合に陽性と判定した。また、提案施設の背景データに基づく「一定の基準を満たす施設」の基準を構築した。

【結果と考察】 実験を実施した7施設すべてが「一定の基準を満たす施設」であると判定された。全7実験実施施設で評価した1被験物質及び4実験実施施設で評価したその他の3被験物質については、施設間のばらつきは極めて小さく、すべての施設の判定が一致した。施設間で判定が一致しなかった1物質はどの施設でも高用量でSI値は3付近であり、用量反応関係がみられた。

【結論】 7実験実施施設による5被験物質の結果は、いずれも高い施設間再現性を示した。LLNA-DA法は金属塩にも使用可能であるが、溶媒としてDMSOを用いる場合は塗布操作に注意する必要がある。良好な施設間再現性は事前に技術研修を適切に行ったことが大きな要因のひとつであると考えられる。

3. 2つの研究の評価外の LLNA-DA 法の特徴

3.1 試験法の頑健性

本研究では、可能な限り条件をそろえて試験法の評価を試みた。このため動物種や ATP 発光量の測定器の違いを含めて研究で作成した SOP との違いがどの程度結果に影響するのかは明確ではない。

3.2 動物福祉面について

動物の福祉に関する側面に関して、LLNA-DA 法は LLNA 法と基本的には変わりはない。すなわち、この試験系はマウスを使った *in vivo* の試験法であり動物を使用しない方法ではない。しかしながら、皮膚感作性評価に関して、従来より実施されてきたモルモットの試験と比べて、これらの方法では要求される動物の使用数を減らすことができるという点では利点がある。また、LLNA-DA 法は 7 日目に塗布操作が入るため試験に要する日数は 8 日と LLNA 法と比べて 2、3 日が長くなるものの、これらの方法は感作誘導反応を評価しているため、感作誘発期の評価を行う GPMT 法（24 日程度）や BT 法（38 日程度）に比べて、試験に要する日数が短いという利点がある。また、GPMT 法ではモルモットの感受性を高めるために Adjuvant を用いるが、これは動物に対する負担が大きい。一方、LLNA-DA 法や LLNA 法では Adjuvant を用いないので、Refinement の観点から優れているといえるであろう。

3.3 コストについて

LLNA 法は Radioactive Isotope (RI) 施設で実施する必要があるが、³H で標識されたチミジンの DNA への取り込み量を測定するためにシンチレーションカウンタが必要である。これに対して、LLNA-DA 法は RI 施設で実施する必要がなく、ATP 発光量の測定器はシンチレーションカウンタに比べて相対的に安価である。

また、試薬の観点でも、LLNA-DA 法で用いる ATP 発光量の測定キットは比較的安価であり、測定も容易である。

3.4 SOP とプロトコールに関して

本研究で用いた SOP は、当初の提案施設が作成した LLNA-DA 法プロトコールを基に、バリデーション研究用に作成されたものである。本研究の SOP では、バリデーション研究用に設定された群の構成等に関する事項だけでなく、LLNA-DA 法の操作で重要な点である「細胞懸濁液の調製の実験手順」及び「ATP 量の測定」に関しても補遺として加筆した。提案施設の作成した LLNA-DA 法

プロトコールを今後改訂する際には、本研究で使用された SOP の内容を反映させるべきであろう。

3.5 評価委員による評価結果への返答としてのまとめ

本研究を実施する前に、バリデーション研究の実施に関して日本動物実験代替法学会評価委員会より、以下の助言を受けた。1)中心となる施設には提案施設のダイセル化学工業（株）が務め、SOP を作成し、技術移転を実施する。2)実験実施施設には ATP 発光量の測定器を有することが望ましい。3)実験施設は 1 施設あたり最大 6 被験物質程度が実施可能であろう。4)1 群あたりの動物数は 4 匹がよい。5)濃度設定は公比 10 の 3 濃度で行うのがよい。6)被験物質の候補リストは提案施設の協力を得て作成する。7)バイアスがなるべく少なくなるように、条件をそろえて実施するのが良い。

これらの助言に関して、本研究では 5)の公比 10 での濃度設定をという点が守られていない。5)は施設で被験物質を希釈する際に施設によって公比が異なることがないように統一するという意味であると思われる。本研究では被験物質を配布する際に希釈して送付しているため、施設によって異なる濃度で被験物質を実験することはない。本研究での濃度設定は、過去に提案施設にて実施された実験の SI 値もしくは LLNA 法の文献値に基づき設定された。

4. 総括

LLNA-DA 法は、GPMT/BT 法に比べて動物数の削減、苦痛の低減、定量的な評価が可能という点で優れており、LLNA 法に比べて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利点がある。

統一された SOP に基づき、LLNA 法や GPMT/BT 法で結果が知られている 14 物質を用いて、全 17 施設の実験実施施設による 2 つのバリデーション研究を実施した結果、LLNA-DA 法は実施しやすい試験法であり、施設間差が小さく、GPMT/BT 法に対する代替可能性は LLNA 法とほぼ同等である試験法であることが確認された。

以上より、LLNA-DA 法は皮膚感作性を評価する試験法として有用である。