

## 添付資料 2

皮膚感作性試験代替法（LLNA-DA法）の評価報告書

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（三菱ウエルファーマ（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  $^3\text{H}$  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)

### 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 24<sup>th</sup> 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 (3<sup>rd</sup> 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評価委員会議(2004. 10. 15) 議事録
- 5) 第三回LLNA-DA評価委員会議(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<sup>3</sup>H-Methyl thymidine または <sup>125</sup>I-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, OSHA 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/JNCrj 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解、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（<sup>3</sup>H-Methyl-thymidineまたは<sup>125</sup>I-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化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<sup>3</sup>H-Methyl-thymidineあるいは<sup>125</sup>I-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<sup>3</sup>H-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(Trimelitic 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(CoCl<sub>2</sub>, NiSO<sub>4</sub>)、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

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 NiSO<sub>4</sub> 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少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  $\kappa$  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  $\kappa$  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	+	+	+	+	+
Trimellitic anhydride	+	+	+		
Cinnamic aldehyde	+	+	+	+	+
Isoeugenol	+	+	+		+
Eugenol	+	+	+		+
Benzocaine	+	+/-	+	+/-	
Abietic acid	+	+	+		+
Hexylcinnamic aldehyde	+	+	+		
Citral	+	+	+	+	
Imidazolidinyl urea	+	+	+		+
2-Mercaptobenzothiazol	-	+	+	+	+
CoCl <sub>2</sub>	+	+	+	+	+
NiSO <sub>4</sub>	-	--	+	+	+
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



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いるものと思われた。プロトコールは適切に記述されており、施設内バリデーションの結果も適切にまとめられた。個別データの確認も行えた。これらのことから施設内バリデーションは「GLP 精神に準じて、試験が実施された」と見なして良いと考えた。但し、チェックしたデータは 2 次データであり、生データレベルでの確認は行っていない。試薬調製記録の確認も行っていない。従って、多施設バリデーションはコード化された被験物質をもちいて行い、データの信頼性を更に確認する必要がある。

#### C-3-4) 施設内再現性

Eugenol (10%) について、9 回の繰り返し実験を行っていた。その結果によれば、リンパ節重量の対照群との比 (SI 値) に大きな差は無く、また、その ATP 含量の SI 値は若干ばらついてはいたが、陽性物質の基準である SI 値 3 を超えていた。また、SI 値 3 を示す推定濃度 (EC3) も 3 回の繰り返し実験で Eugenol では 5.09%, 5.59%, 4.23%、Isoeugenol では 3.40%, 2.28%, 2.46% と大きな差は無かった。以上より、申請法の陽性と陰性との識別における再現性は良いと判断される。

#### C-3-5) 施設間再現性

多施設でのバリデーションが実施されていないことから、判断できなかった。

#### C-3-6) 比較対照とした in vivo データの妥当性

Haneke ら (2001) や Basketter ら (1992) の適切な論文に掲載されたマウス、モルモット及びヒトでの実験結果と比較している。

#### C-3-7) 試験法の頑健性

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、頻繁に陽性対照を用いて試験を実施し、その反応性を確認する必要がある。また、ATP 含量測定に用いる試薬はメーカーにより発光度や減衰が異なることから、予試験で定められた適切なプロトコールに厳密に従って実施する必要がある。

#### C-3-8) 動物福祉面からの妥当性

申請法は 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、動物に与えるストレスが少ない。また、LLNA と異なり尾静脈注射の段階が無く、動物の拘束や苦痛が少ない。また、使用動物数はモルモットを用いた Maximization 法などの従来法では 1 群 5 匹以上が要求されているが、申請法では 3 匹以上と少ない。これらのことから、申請法は従来法より動物福祉の面で優れていると考えられる。

#### C-3-9) 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、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、本法では RI 施設は必要なく、用いる ATP 測定装置は相対的に安価である。

#### C-3-10) 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 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 法も同様である。

### C-4) 評価委員会で特に審議した問題点

#### C-4-1) LLNA-DA 法の位置づけについて

LLNA-DA 法は感作性試験の代替法としてではなく、LLNA 法の代替法として提案されたため、LLNA 法との原理面から見た同等性について懸念があった。そのため、LLNA-DA 法の 4 回目の投与によりリンパ球のサブクラス (T 細胞および B 細胞) がどの程度変化するかを調べ、両者の感作誘導法の質的な違いを検討した。その結果、いずれの被験物質においてもリンパ球の増殖が起こる中で B 細胞の増殖が起こり、それに伴って B 細胞の比率の増加が認められた。したがって、LLNA-DA 法と LLNA 法の感作誘導における差は主としてどれだけリンパ球を増殖させたかという違いで質的な差は少なく、原理的に見て LLNA-DA 法は LLNA 法の延長上と考えて良いと結論した。ただし、リンパ球の増殖における量的な違いは認められるので、LLNA 法との同等性についてはバリデーションでさらに検証していく必要があると考えられる。

#### C-4-2) LLNA-DA 法のプロトコールの問題点について

LLNA-DA 法のプロトコール上の問題点について検討した結果を以下に示す。

##### 1) 被験物質の4回目処置について

LLNA 法は被験物質を連続3日間処置するのに対し、LLNA-DA 法は6日目または7日目に4回目の処置を行う。このため感作誘導期の反応を捉えるとされている LLNA 法とは異なり、感作誘導期だけでなく誘発期の反応も加わってしまうことが懸念された。これについては以下のような意見があったが、最終的にエンドポイントとしている耳介局所のリンパ節に起こっている現象だけを捉えた場合、従来の LLNA 法と差がないという結論に至った。

感作誘発期の反応の影響は少ないとする意見：

- ①申請者の実験によると4回目の塗布において耳介に外見的に大きな変化は認められず、耳の反対側に Challenge したとき、免疫応答がでるのは10日目位からである。したがって、4回目の塗布を行う時点では感作誘発期の反応の関与は少ないと考えられる。
- ②LLNA-DA 法を用いて4回目の投与後のリンパ球サブクラス(T細胞およびB細胞)解析を行ったところ、LLNA-DA 法と LLNA 法の感作誘導で質的な差が少なかった。

感作誘発期の反応も加わっているとする意見：

- ①4回目の塗布時に「惹起」というような反応が起こりうるか否かは被験物質の種類及び濃度によると考えられる。感作誘導期の反応の影響が現れないとは言い切れない。
- ②DNCB のように強い感作性物質では比較的早期に感作が成立して、LLNA-DA 法の4回目の投与の時点では惹起過程にあると推測している。リンパ球のサブクラス(T細胞およびB細胞)解析のデータで DNCB における B 細胞が若干高いのは惹起反応であるかもしれない。

また、もし4回目の処置により B 細胞の増殖が過剰になると体液性免疫を検出する試験法であるマウス膝窩リンパ節試験(PLNA)との差がなくなり、細胞性免疫を検出する試験法としての位置づけが変わる懸念が指摘されたが、リンパ球のサブクラス(T細胞およびB細胞)解析において LLNA 法と LLNA-DA 法で質的な差は少なく、B 細胞の過剰な増殖も認められなかったため、問題ないと結論した。

##### 2) ATP 含量を細胞増殖の指標とした点について

ATP はリンパ節中の非増殖細胞中にも含まれており、ATP 含量の変化は必ずしも細胞増殖に平行しているものではない。また、周囲組織の ATP も一部測定されてしまう可能性もあるが、スライドグラス上での塗末によりリンパ細胞がうまく分散し、周囲組織を避けて採取できることから、その関与は少ないと考えられる。実際、申請法のプロトコールにより LLNA 法とほぼ同等の被験物質濃度で同様の SI 値が得られている。

##### 3) Sodium lauryl sulfate (SLS) 処置について

LLNA-DA 法は LLNA 法と異なり、1% SLS 溶液での前処理を行っている。SLS は LLNA 法で偽陽性となる。LLNA-DA 法でも同様に偽陽性であった。また、SLS が被験物質の反応に影響を与える可能性も考えられる。SLS の処置は被験物質の感作性評価において問題とならないかとの指摘があった。しかし、LLNA で反応が起こるのは、より高濃度の SLS で処置した場合であり、LLNA-DA 法では反応の起きない濃度を用いている。また、感作性を持たない被験物質が、1% SLS による僅かな細胞増殖活性が影響を与え、結果として偽陽性となるようなケースについての知見はない。一方、SLS でランゲルハンス細胞の遊走が増加するとされており、1% SLS の影響は Eugenol, Isoeugenol 及び HCA で約 20% の SI 値の増加が認められている。これは LLNA-DA 法の感度上昇に役立っており、結果として、LLNA と同様の SI 値と EC3 値が得られた。また、感作性物質の識別能も LLNA とほぼ同様であった。

なお、SLS はもともと水溶性の被験物質に適用するために用いられたものである。脂溶性の被験物質に用いることの意義に疑問があるとも指摘された。SI 値の閾値を下げることにより、SLS を使用しなくとも良いかも知れないとの指摘もあった。しかし、識別値を変えるとその値の妥当性の検討のために大きな追加実験を行わなくてはならなくなることから、実施困難であるし、今回の評価委員会の審議の範囲を超えるものであると考えられた。また、行政上は偽陰性を恐れることから、SLS 使用により多少偽陽性が増えても、それで試験法の感度が上がり、偽陰性が低下するのであれば、処置の意味はあると考えられた。

##### 4) 使用動物数について

使用動物数は LLNA 法では4匹以上であるが、申請法では3匹以上としている。ATP 含量のバラツキが大きいが1群3匹で十分であるか検討した。申請者は ATP 発光量のばらつきは、実験操作や ATP 測定法に起因するのではなく、リンパ節中の細胞数の実際のばらつき、即ち、試験における動物の個体差を反映したものであると考えている。個体差を生じる原因は、動物自身の感受性の差、さらには被験物質を耳介に塗布すると

言う実験操作に由来すると思われる。動物数は4匹以上がベターであろうが、3用量をとっていることから、3匹でも実用上の問題は起きていない。動物数を削減する意味からも、増やす事は好ましくないと考えた。しかし、3匹で充分であることを示すには、3例で原法同様の精度(バラツキ)である事を示す必要がある。LLNA法での4匹と、LLNA-DA法での3匹とでEC3値の点推定値と信頼区間が同程度であれば、3匹でも良いということになるが、今回の評価期間中にそれを示すのは困難であった。このように、LLNAの代替法とするならば例数を減らしてもよいという根拠を示す必要があるが、それを示すのは困難であることから、バリデーションの際は4匹以上を用いるのが良いとされた。

#### 5) 対照物質について

LLNA法では陽性対照としてHCAを使用しているが、LLNA-DA法ではEugenolを使用している理由について申請者に問い合わせたところ次のような回答がなされた。

- ① OECDガイドライン429では、HCAまたはMercaptobenzothiazolを陽性対照物質として推奨し、SIが3を超え、かつSIが大きくなり過ぎない用量で用いることとしている。但し、十分な根拠があれば、同等の感作性ランクの陽性対照物質を用いることも可能とされている。
- ② 当初Eugenolを使用して検討を行ってきた経緯から、Eugenolの蓄積データが最も豊富であったため、陽性対照物質として採用した(10%用量では、 $SI=4.99 \pm 1.35$  (n=18))が、現在はHCAの蓄積データが揃ってきたため、HCAを陽性対照物質としている。15%用量で $SI=4.08 \pm 0.91$  (n=13)である。このように、HCAは安定性に優れていると報告されているため、陽性対照物質としてはより望ましいと考えられる。
- ③ 陽性対照の反応は溶媒が同じで有る限り、大きな差が出たことは無い。

また、陽性対照はヒトに与える影響が大きいので、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が出た。また、当面はLLNA法で使用されており、バリデーションに際しては、安定したデータが得られるHCAを陽性対照として用いるのが良いだろうとされた。

#### C-4-3) プロトコールは詳細かつ適切に書かれているか

プロトコールは詳細に記載されており、下に示した一部を除き問題無いと思われた。

##### 1) SLS塗布法について

SLSの塗布法が具体性に欠けるとの指摘に応じ、具体的な方法が示された。なお、ピペットマンを使用して一定量を投与することも不可能ではないが、水溶液であるため耳介表面になじみにくく、全体に均一に塗布するのが困難である。また塗布に時間を要する。これらのことを考慮し、LLNA-DA法では筆による塗布を採用した。

##### 2) ATP測定法について

ATP測定に影響する被験物質はないかとの質問があった。これに対し、1)細胞懸濁液を100倍希釈して用いることから、通常、残留した被験物質が直接発光に影響することは考えられない。しかし、2)ATP合成を促進する薬物や阻害する薬物の場合はATP含量に影響するが、これらの場合はリンパ節重量の変動と合わせて評価することにより、判定できると回答された。

ATP測定までの時間による影響や試薬のロット差について質問された。これに対し、ATP測定の直線性、試薬差、ロット差、発光の時間経過、ATPの安定性に関するデータが示された。また、ATP測定試薬はCAMBREX社(LumiTech™ViaLight™H)とKIKKOMAN社(ルシフェール250プラス)が使用可能である。発光量や減衰性はキット間やロット間で差がある。即ち、KIKKOMAN社の方が発光量が10倍位多いが、発光の減衰が早い。CAMBREX社の製品では1%/min位の早さで減衰する。

具体的には、リンパ節摘出後ATP含量は経時的に低下することから、リンパ節摘出から発光測定までの操作は、概ね20分以内で終え、かつ、個体ごとの経過時間をできるだけ揃える事が望ましい。また、酵素(AMR)添加後は、発光量が急速に減少することから、酵素添加後はできるだけ時間を置かずに測定することが望ましい。測定は1サンプルずつ、酵素添加後直ちに行うとすれば、操作自体は数秒以内終わるため、実際上問題はない。また、100倍希釈懸濁液をドライアイス/メタノール中で凍結させることによりATPの低下が抑制される。KIKKOMAN社の試薬では数秒で測定が終了するが、CAMBREX社の試薬では約5分かかる。グループで作業する場合はCAMBREX社の試薬が便利だが、一人で作業する場合はKIKKOMAN社の試薬が使用しやすい。

#### C-4-4) 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。記載された感作性強度区分は、既報のGPMTによる感作性強度区分とヒトの感作性強度区分に基づくものであり、LLNA-DA法のEC3による感作性強度区分ではない。近年、LLNA法のEC3に基づく感作性強度区分が提案されており、それによると、EC3が0.1%未満のものをExtreme、 $0.1\% \leq EC3 < 1\%$ をStrong、 $1\% \leq EC3 < 10\%$ をModerate、 $10\% \leq EC3 \leq$

100%を Weak としている (Kimber et al 2003, Gerberick et al 2004)。この基準に従って、LLNA-DA 法で評価した感作性物質の強度区分と LLNA 法による既報の強度区分とを比較すると、両者はほとんど同じ分類になる。2-Mercaptobenzothiazol が偽陰性であることを除くと、一致しているかまたは Moderate と Weak 間の 1 区分の相違である。

#### C-4-5) 刺激性物質と感作性物質の識別について

Gerberick らは B220 細胞は感作性物質で増加し、刺激性物質では増加しないことを見出し、これを指標にして刺激性物質と感作性物質が区別できると報告している。今回のリンパ球サブクラス解析データは刺激性物質の SLS により B220 細胞が増加しており、Gerberick らと反対の結論になる。この違いに関して申請者は今回のデータでは SLS の用量が 10% であるのに対し、Gerberick の実験は 20% SLS で実施されており、SLS の毒性により B220 細胞が増加しなかった可能性がある。また、刺激の強いものでは用量反応関係が崩れることがある。Gerberick らの論文の結論と食い違っているが、SLS で B 細胞が増加すると考えざるをえない。一方、内部データではあるが、15% SLS で B 細胞は増えていたとも報告された。

#### C- 5) 特許の状況

多くの方々を使用してもらおうよう、特許出願していない。

#### D. 現時点での総合評価

- 1) 評価委員会では LLNA-DA 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、また、簡便かつ迅速に結果が得られるにも関わらず、原法である LLNA 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方法であると判断し、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と考えた。
- 2) LLNA-DA 法は、LLNA 法より主としてエンドポイント並びに投与操作、日程を変更しているが、エンドポイントの原理、リンパ球サブクラス (T 細胞および B 細胞) の解析結果及び得られた SI 値から見て、LLNA 法と原理的に異なる試験ではないと考えられる。ただし、ATP 含量の変化は必ずしも細胞増殖に平行していないことに由来する微妙なエンドポイントの違い、並びに感作誘導時のリンパ球の増殖における量的な違いなどが認められるので、LLNA 法との同等性についてはバリデーションでさらに検証していく必要があると考えられる。
- 3) LLNA 法と同様に金属類への感度が低い。また、刺激性を有する界面活性剤で偽陽性を出現させる可能性がある。
- 4) 詳細なプロトコールが用意されている。また、今回の評価委員会の指摘を踏まえ、微細な修正が行われる予定である。
- 5) 結果の判定方法の妥当性については、SI 値 3 が識別値になるように、SLS 前処置を加えてある。その必要性については議論があったが、特に、感作性試験法として不適切とは言えない。
- 6) ATP 測定を決められた時間内に正確に行わなければならないが、その他の点については、比較的容易に実行できるものと思われる。

#### 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) Core laboratory はダイセル化学に努めてもらい、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。
- 2) バリデーションに協力してもらおう機関は LLNA 法を行ったことがあり、ATP 測定装置を有する機関とするのが良い。
- 3) 試験期間を 1 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ー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 検体まで可能であろう。
- 4) 1 群当りの動物数は LLNA-DA 法では 3 匹であるが、LLNA-DA 法は LLNA 法よりも動物数を減らすこと事を主眼とした代替法ではないこと、また、3 匹では 1 匹分のデータが使用不能になった場合に解釈が困難になることから、LLNA 法に準じて 4 匹が良い。
- 5) 用量段階は、公比 1.0、3 用量で行うのが良い。
- 6) 被験物質候補リストはダイセル化学工業 (株) の協力を得て作成する。
- 7) 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. 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, 1992.
- Basketter DA, Gerberick GF, Kimber I, Loveless SE. The local lymph node assay: a viable alternative to currently accepted skin sensitization tests. *Food Chem Toxicol.* 34, 985-97, 1996.
- De Jong WH, Tentij M, Spiekstra SW, Vandebriel RJ, Van Loveren H. 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, 2002.
- Haneke KE, Tice RR, Carson BL, Margolin BH, Stokes WS. ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. Data analyses completed by the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 274-286, 2001.
- Gerberick GF, Cruse LW, Miller CM, Sikorski EE, Ridder GM. 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. A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis*, 50, 274-288, 2004.
- Kimber I, Mitchell JA, Griffin AC. Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. *Food Chem Toxicol.* 24, 585-586, 1986.
- Kimber I, Basketter DA, Butler M, Gamer A, Garrigue JL, Gerberick GF, Newsome C, Steiling W, Vohr HW. Classification of contact allergens according to potency: proposals. *Food Chem Toxicol.* 41, 1799-1809, 2003.
- OECD: OECD guideline 429 Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, (adopted 24th April 2002)
- 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.

以上

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\*

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）

（所属は平成17年7月30日現在）

\*: 平成16年12月まで田中憲穂が、その後は大野泰雄が委員長を務めた。なお、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テ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。

皮膚感作性試験代替法（LLNA-DA 法）の二次評価報告書

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) 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。その結果、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 法のものと同じであった。

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。

## A. 目的

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大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。最近、これらの点を解消する試験法として 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  $^3\text{H}$  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 Bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みをみる方法 (Takeyoshi et al, 2003) も報告されているが、まだ、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 (LLNA-DA 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、かつ比較的短期間の方法であり、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 16 年度より検討を行った。その結果、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、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。代替法学会のバリデーション委員会はこの依頼を受け、LLNA-DA 法バリデーション研究実行委員会を組織し、バリデーション研究を行った。本二次評価は、このバリデーション研究報告書並びに関連して収集した情報に基づき、LLNA-DA 法が LLNA 法の代替法として妥当であるか否かを評価するものである。

## B. 評価方法

### B-1) 評価組織

一次評価書に記載した。

なお、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。

### B-2) 提案者

一次評価書に記載した。

### B-3) 秘密の保持と評価結果の公表について

一次評価書と同一であることから省略



#### B-4) 評価に使用した資料および会議資料

二次評価に使用した資料について、以下に示した。

資料 1) 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

資料 2) LLNA-DA 法バリデーション研究報告書 (概括) Version 10 (2007. 5. 18)

資料 3) LLNA-DA 法バリデーション研究 (第 1 実験) 報告書 Version 2. 1 (2007. 6. 27)

資料 4) LLNA-DA 法バリデーション研究 (第 2 実験) 報告書 Version 1. 1 (2007. 6. 27)

資料 5) LLNA-DA 法バリデーション研究結果報告 (説明資料)

資料 6) LLNA-DA 法による 3 1 物質の評価結果 (ダイセル化学工業株式会社評価解析センター 出原賢治、2007. 11. 8)

資料 7) LLNA 法バリデーション研究における追加資料 被験物質の溶媒中での安定性に関する検討結果 (ダイセル化学工業株式会社 評価解析センター 出原賢治、津野真澄、2007. 11. 8)

資料 8) 平成 19 年度第一回評価委員会議事録

資料 9) 平成 19 年度第二回評価委員会議事録

#### 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、代替法学会のバリデーション委員長であり、LLNA-DA 法バリデーション実行委員長である大森崇博士よりバリデーションの計画と実施経過および結果について説明を受けた。その報告について、質疑応答を行った上で、LLNA-DA 法の再現性について評価を行った。また、今回のバリデーションの結果、および申請者であるダイセル化学工業 (株) より提供を受けた資料を合わせて、LLNA 法の代替法としての評価を行った。

なお、多施設バリデーションへの参加施設および被験物質は以下のとおり。参加申し込み施設が多かったことから、2 回に分けてバリデーションが行われた。

#### B-6) バリデーション参加者および参加施設名 (表 1)

バリデーション参加施設は表 1 に示したように 23 施設であり、それぞれの施設の代表者は、LLNA-DA 法バリデーション実行委員として計画の立案、実行、データ解析に関与した。このうち、17 施設が実験を行う施設となった。これは当初、バリデーション委員会が参加施設を公募したところ、19 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、実験施設を選択せざるを得なかった。そこで、LLNA 法やそれに準じた試験法を実施した経験の有無、代替法学会のバリデーション委員会の評価委員会に委員が属するか否か、6 物質の被験物質が実施できるか否か、後に実施されることになっていた LLNA 法の別の変法である LLNA-BrdU 法への参加を希望するか否か、測定機器の所持状況などが勘案され、最終的に 2 回の実験に分け、第 1 実験では 10 施設、第 2 実験では 7 施設がこのバリデーション研究の実験を行う施設となった。

#### B-7) 被験物質名 (表 2)

第 1 実験で用いられた 12 種の被験物質および第 2 実験で用いられた 5 種の被験物質を表 2 に示した。

## C. バリデーシヨンの結果および考察

### C-1) 被験物質の選択

第1実験では陽性物質8種 (A: 2,4-dinitrochlorobenzene、B: hexylcinnamic aldehyde、C: 3-aminophenol、D: glutaraldehyde、E: cobalt chloride、F: isoeugenol、G: formaldehyde、K: abietic acid)、陰性物質4種 (H: dimethyl isophthalate、I: isopropanol、J: nickel sulfate、L: methyl salicylate) が用いられた。

第2実験では陽性物質3種 (B: hexylcinnamic aldehyde、E: cobalt chloride と N: potassium dichromate)、陰性物質2種 (J: nickel sulfate、M: lactic acid) が用いられた。LLNA法の文献値より、A、Dは非常に強い感作性物質、E、G、Nは強い感作性物質、B、C、Fは中程度の感作性物質、Kは弱い感作性物質、H、I、J、L、Mは感作性陰性物質とされている。また、JはLLNA法では陰性と報告されているが、ヒトで多くの臨床例があり、感作性陽性であることが明確になっている。

即ち、重複しているものを一つと数えると、陽性物質9物質、陰性物質5物質を用いており、評価委員会はLLNA-DA法によるSI値の施設間再現性、並びにLLNA法陽性物質、陰性物質の判別の施設間再現性を評価することは可能であると判断した。しかし、LLNA法との結果の対応性を含む、皮膚感作性試験としての全般的な能力を評価する上では不十分であり、申請者から提出されたデータを含めて評価することとした。

### C-2) 被験物質の取り扱い

本バリデーシヨン研究では試料等手配担当者が被験物質を媒体に一定濃度に溶かしたものを各施設へ配布しているため調製から投与までに日数(最大20日間)が経過していることが、被験物質の安定性の観点で注目された。バリデーシヨン研究報告書ではこれに関連する考察が不足しており、評価委員会で考察することとした。被験物質調製時には高濃度のJ(nickel sulfate)とK(abietic acid)を除いて残り全ての被験物質が溶解していたのに対し、投与時には6物質で析出、沈殿が生じていた。即ち、第1実験では、被験物質C(3-aminophenol)、E(cobalt chloride)、H(dimethyl isophthalate)、I(isopropanol)、J(nickel sulfate)、K(abietic acid)において、送付前の調製時に認められなかった析出や沈殿が投与時に認められた(LLNA-DA法バリデーシヨン研究(第1実験)報告書 表3.2.2.及び3.3.1)。その際、H(dimethyl isophthalate)とI(isopropanol)については施設により析出・沈殿の現れ方に差が認められた。また、E(cobalt chloride)とJ(nickel sulfate)は、沈殿を超音波処理により溶解させて投与した施設と懸濁液で投与した施設があった。被験物質の調製時には溶解した物質が施設に送付され、析出、沈殿を生じ、その析出物が再溶解しづらくなる現象があったようである。これらにより、投与時の被験物質溶液が名目上の濃度より低下している可能性が考えられ、試験結果の検討の際には考慮しなければならないと考えられた。

溶媒の性質については、バリデーシヨン研究(第1実験)報告書の20ページには「被験物質を入れた容器がプラスチックであったため、溶媒としてacetone/olive oil(A00)を用いると容器が溶ける可能性が示唆された」との記載がある。そのため、溶媒中の被験物質の安定性を検討する前に、溶けた容器の成分が直接、ATP発光量に影響を与える可能性が懸念された。そこで、溶媒対照群のデータのうちA00を用いた群

と他の溶媒を用いた群に着目した。なお、DMSO塗布群ではDMSO自体によりATP発光量が上昇するので、A00塗布群とacetone塗布群を検討した。その結果、同一溶媒を用いた施設間の差の方が、異なる溶媒を同一施設内で用いた際の差より大きいと考えられることから、溶媒の違いによって反応性に大きな差があるとはいえないと考えられた。このことにより、仮に容器の成分が溶けたとしても、容器の成分が直接、ATP発光量に影響を与えないと考えられた。しかし、溶けた容器の成分が被験物質の溶解性に影響を与え、試験結果に影響する懸念がある。E (cobalt chloride)は、第1回のバリデーションで全ての施設で析出、沈殿が認められたが、輸送容器をプラスチック容器からガラス容器に変えた第2回目では沈殿は認められなかった。このことは第1実験においては、容器 (の溶けた成分)が被験物質の析出、沈殿に影響を与えている可能性を示唆するものと考えられる (第2実験では輸送容器をガラス製にしたためこのような容器による懸念は無いと考えられる)。第2実験では被験物質B、E、M、Nはいずれも調製時の被験物質の状態と投与時の状態は一致していた (LLNA-DA法バリデーション研究 (第2実験) 報告書表3.2.2. 及び 3.3.1)。J (nickel sulfate)については調製時に高濃度においてのみ懸濁状態であったが、投与時には全ての濃度で沈殿等の変化が認められ、超音波処理し懸濁液として投与された。N (potassium dichromate)については凝固等の変化が認められたが、溶解させた後に投与された。

被験物質の安定性に関する評価委員会での議論について、ダイセル化学工業 (株) より B (hexylcinnamic aldehyde)、C (3-aminophenol) および K (abietic acid) は調製後 22 日間にわたり安定であったとの結果が提供された (LLNA 法バリデーション研究における追加資料 被験物質の溶媒中での安定性に関する検討結果 2007. 11. 8)。このデータにより、バリデーション試験時には、これら 3 被験物質が定められた媒体中で安定であるという結果が示された。しかしながら、容器が溶ける可能性を考慮に入れ、同じ容器、同じ保管条件を用いた安定性試験結果ではなかった。実際に第1実験の時に被験物質調製時の物質の状態と投与時の状態とが異なっているという情報がバリデーション研究報告書中に記載されているため、この提供された結果のみをもって、第1実験において調製時と同じ状態の被験物質が試験施設で投与に供されたことの保証にはならないと考えられた。

変質のない被験物質が試験施設に配布され投与に供されることにより、施設間再現性、LLNA との一致性の検討が可能となるため、この間の安定性に懸念がある場合には慎重に評価を進める必要がある。評価委員会は、すでに終了した実験結果を知った後に、問題のありそうな物質を除くことはバリデーション評価として妥当性に欠くことから、計画した通りの全体で評価することを基本とし、追加検討として物質の安定性に問題がないと推定される物質のみでも施設間再現性を考察し、双方を総合的に勘案して結論をもつこととした。なお、安定性に問題がないと推定される物質としては、調製時の状態と投与時の状態が一致していることを重要視し、第1実験では A (2,4-dinitrochlorobenzene)、B (hexylcinnamic aldehyde)、D (glutaraldehyde)、F (isoeugenol)、G (formaldehyde)、L (methyl salicylate)、第2実験では B (hexylcinnamic aldehyde)、E (cobalt chloride)、M (lactic acid)、N (potassium dichromate) とした。被験物質の安定性についてのまとめを表3に示した。

### C-3) LLNA-DA法によるSI値の施設内再現性

施設内再現性については、第1実験および第2実験において陽性対照物質である25% hexylcinnamic aldehydeを用いて検討した。その結果、それぞれの報告書の図3.5.2および表3.8.1で示されたように、 $\exp(\tau^2)$  は一番大きかった施設においても1.05であり、ほとんどの施設で最小値の1に近い値であった。

これらの結果から、評価委員会はLLNA-DA法の施設内再現性は良好であると判断した。

### C-4) LLNA-DAによるSI値の施設間再現性

12物質を用い、10施設で行われた第1実験では、指標として用いた $\exp(\tau^2)$ が1.00~4.15の値であったが、飛びぬけて大きな値を示したのはE(cobalt chloride)とJ(nickel sulfate)の高濃度(順に、2.64、4.15)だけであり、E、JおよびD(glutaraldehyde)の中濃度(1.36)を除き、全て1.2以下であった(第1実験報告書:表3.7.1)。なお、 $\exp(\tau^2)$ 値とはバリデーシオンの試験でのSI値から算出したばらつきの指標であり、1.2は施設間差が小さくないと認めうる基準値として、バリデーション研究報告書で提案されている値である。一方、5物質を用い、7施設で行われた第2実験ではE(cobalt chloride)を含め、全て $\exp(\tau^2)$ が1.2以下であった。第1実験におけるE(cobalt chloride)、J(nickel sulfate)は、いずれも2施設が懸濁液として、1施設が超音波処理により溶解確認後に溶液として投与したと報告されており、投与液の状態の差が施設間のばらつきに影響していると考えられた。

評価委員会において安定性に問題ないと推定した被験物質で同様な検討を行ったところ、第1実験におけるD(glutaraldehyde)の中濃度を除き、第1実験と第2実験の全てにおいて $\exp(\tau^2)$ が1.2以下であった。

これらの結果から、評価委員会はLLNA-DA法の施設間再現性はおおむね良好であると判断した。

### C-5) LLNA-DA法による感作性の有無の評価の施設間再現性

10施設の参加で行われた第1実験において(表4-1)、陽性物質として用いたA(2,4-dinitrochlorobenzene、10施設)、B(hexylcinnamic aldehyde、10施設)、F(isoeugenol、3施設)、およびK(abietic acid、3施設)はいずれの施設においても陽性と判定された。しかし、同様に陽性物質として用いたD(glutaraldehyde)、E(cobalt chloride)、G(formaldehyde)は3施設中1施設が陰性と判定され、C(3-aminophenol)は3施設とも陰性と判定された。このうち、E(cobalt chloride)とC(3-aminophenol)については析出、沈殿が認められており、実質の濃度の低下が原因となり陰性となった可能性が考えられた。一方、陰性物質については、H(dimethyl isophthalate、3施設)、I(isopropanol、10施設)、L(methyl salicylate、3施設)はいずれの施設でも陰性と判定されたが、J(nickel sulfate)は3施設中1施設が陽性と判定された。J(nickel sulfate)は、析出物を超音波処理して溶解確認後に投与した施設では陽性を示し、懸濁適用した2施設はそれぞれ陽性、陰性となり、ばらつきが認められていた。同じく溶解状態や懸濁状態が原因となって陽性、陰性を分けた可能性が考えられた。本物質はLLNA法陰性の報告が多いが、LLNA法で陽性とのRyanらの報告(Food Chem. Toxicol 40, 1719-1725, 2002)もある。

一方、7施設の参加で行われた第2実験では(表4-2)、陽性物質であるB(hexylcinnamic aldehyde)、

N (potassium dichromate) は7施設、全てで陽性と判定され、陰性物質であるJ (nickel sulfate)、M (lactic acid) は4施設、全てで陰性と判定された。陽性物質であるE (cobalt chloride) については、4施設の結果が陽性2施設、陰性2施設に分かれた。

評価委員会において安定性に問題ないと推定した被験物質で同様な検討を行ったところ、第1実験においては、陽性物質として用いた被験物質A (2,4-dinitrochlorobenzene、10施設)、B (hexylcinnamic aldehyde、10施設) およびF (isoeugenol、3施設) はいずれの施設においても陽性と判定された。しかし、同様に陽性物質とされているD (glutaraldehyde)、G (formaldehyde) は3施設中1施設において陰性と判定された。陰性と判定した1施設における高濃度のSI値はDが2.57、Gが2.69と3を超えないものの3付近の値であり、いずれも3用量の値に用量反応関係があるので、現実には実験が行われる場合には仮に陰性と判定された場合、より高い用量での再実験が行われると思われることから、この不一致は実際的には大きな問題にならないと考えられた。一方、陰性物質については、I (isopropanol、10施設)、L (methyl salicylate、3施設) はいずれの施設でも陰性と判定された。

第2実験では陽性物質であるE (cobalt chloride) の判定が陽性と陰性、2施設対2施設に分かれた。被験物質Eは、第1実験では塗布操作の影響と考えられる大きなばらつきが認められたが、第2実験では改善され、ばらつきは小さくなった。第2実験で施設間に評価の差が生じたのはSI値が最高濃度の5%でもSI値3を超えないが3付近であるためと考えられる。3用量の値に用量反応関係があるので、現実には実験が行われる場合にはより高い用量での再実験が行われると思われ、実際的には大きな問題にならないと考えられた。

#### C-6) LLNA-DA法の感度、特異性、予測性、正確性

第1実験の結果を表4-1、第2実験の結果を表4-2にまとめた。また、第1実験の結果を参加施設の結果を被験物質毎に集計し、多数施設での判定をもとに、LLNA-DA法の結果をLLNA法の結果と比較したところ(表4-3)、感度 (sensitivity: 陽性物質を陽性と判定する能力) 87.5%、特異度 (specificity: 陰性物質を陰性と判定する能力) 75.0%、陽性検出力 (positive predictivity: 陽性との結果が得られた物質が陽性である割合) 87.5%、陰性検出力 (negative predictivity: 陰性との結果が得られた物質が陰性である割合) 75.0%、正確性 (accuracy: 判定結果が正確である割合) 83.3%であった。なお、評価委員会において安定性に問題ないと推定した6被験物質 (陽性5物質、陰性1物質) で同様な検討を行ったところ、LLNA法とLLNA-DA法の結果は全て一致した。

第2実験では施設により評価が半数づつ陽性と陰性に分かれたE (cobalt chloride) を除き、4被験物質 (陽性2物質、陰性2物質) を用いて検討したところ、LLNA-DA法の結果とLLNA法の結果は一致した。

評価委員会はLLNA-DA法によるE (cobalt chloride) の結果から考えて金属類の評価においてLLNA-DA法はLLNA法と同等の結果が得られないことがあると考えたが、それ以外の物質においては、ほぼ同等な評価を行えるものと考えた。なお、C (3-aminophenol) については、安定性の問題があり、偽陰性物質と断定することはできなかった。最終的に、バリデーションで用いた14物質の結果と一次評価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-DA法の総合的な代替の可能性について結論できず、LLNA法とLLNA-DA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、合わせて以下に検討した。

#### D. 申請者の提出データをあわせた解析結果に基づく LLNA-DA 法による代替可能性の考察

申請者は 31 物質についての自家試験結果をまとめて評価委員会に平成 19 年 11 月 8 日に提出した。それによれば、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 20 物質のうち mercaptobenzothiazol を除く 19 物質について LLNA-DA 法で陽性であった（感度 95.0%）。また、LLNA 法で陰性とされた 10 物質のうち benzalkonium chloride を除いた 9 物質で LLNA-DA 法で陰性との結果が得られた（特異性 90.0%）。陽性検出力は 95.0%、陰性検出力は 90.0%、正確性は 93.3%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用性試験法（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-DA 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。

今回のバリデーションでは新たに加えた 3-aminophenol がおそらく安定性が原因となって偽陰性になり、cobalt chloride において施設間で評価の違いが認められ、その他若干の施設間での違いが認められたが、申請者の結果とほぼ同等の結果が得られた。これらの結果から、評価委員会では、金属類あるいは mercaptobenzothiazol に構造的に近い物質などの中に注意すべき物質があると思われるが、LLNA-DA 法は 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-DA 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-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。

以上

表1：LLNAバリデーション実行委員および所属施設

	氏名	所属施設	役割	担当*
1	大森 崇	京都大学大学院医学研究科医療統計学分野	委員長	データ解析
2	小島 肇	国立医薬品食品衛生研究所薬理部	委員	被験物質供給
3	寒水孝司	大阪大学臨床医工学融合研究教育センター	委員	データ解析
4	吉村 功	東京理科大学工学部経営工学科	委員	データ解析
5	出原賢治	ダイセル化学工業（株）評価・解析センター	委員	申請者、実験実施
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	委員	実験実施
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	委員	実験実施
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	委員	実験実施
9	小坂忠司	（財）残留農薬研究所 毒性部	委員	
10	浦谷 衛	石原産業（株）中央研究所 安全科学研究室 安全性グループ	委員	実験実施
11	山中 淳	ピアス（株）中央研究所 ARI 評価グループ	委員	実験実施
12	篠田伸介	（株）薬物安全性試験センター埼玉研究所 第二毒性部	委員	実験実施
13	中村洋介	住友化学株式会社 情報電子化学業務室	委員	実験実施
14	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	委員	実験実施
15	米田知史	トーアエイヨー（株）研究開発部 福島研究所	委員	実験実施
16	花田智彦	日本新薬（株）創薬研究所 安全性研究部	委員	実験実施
17	猪田健人	中野製薬（株）マーケティング本部研究	委員	
18	田中正志	明治製菓（株）医薬開発部門 動態安全性研究所	委員	実験実施
19	有馬和範	大正製薬（株）安全性研究所	委員	実験実施
20	宇佐美雅仁	ホーユー（株）総合研究所 基盤技術研究室	委員	実験実施
21	篠田直樹	参天製薬（株）奈良研究開発センター	委員	実験実施
22	湯浅敦子	富士フイルム（株）CSR 推進部 環境・品質マネジメント部素材試験センター	委員	実験実施
23	牧 栄二	（財）食品農医薬品安全性評価センター	委員	実験実施

#:委員会でのバリデーション実施に関する審議以外に特に担当した分野

表2：バリデーションで用いられた被験物質

被験物質コード	物質名	感作性の有無と程度*	第1実験	第2実験
A	2,4-dinitrochlorobenzene	非常に強い	○	
B	hexylcinnamic aldehyde	中程度	○	○
C	3-aminophenol	中程度	○	
D	glutaraldehyde	非常に強い	○	
E	cobalt chloride	強い	○	○
F	isoeugenol	中程度	○	
G	formaldehyde	強い	○	
H	dimethyl isophthalate	無し	○	
I	isopropanol	無し	○	
J	nickel sulfate	無し**	○	○
K	abietic acid	弱い	○	
L	methyl salicylate	無し	○	
M	lactic acid	無し		○
N	potassium dichromate	強い		○

\*: LLNA 法での評価結果に基づく判定

\*\*：ヒトでは陽性と報告されている。



表3 被験物質の安定性についてのまとめ

	被験物質	媒体 <sup>1)</sup>	容器	調製時 (配布前) の状態	投与時の状態	調製時 の状態 と投与 時の状 態の一 致	22 日間 の安定 試験デ ータ <sup>2, 3)</sup>	安定性に 問題がな いと推定 し、別途 解析する 被験物質
第 1 実 験	A: 2, 4-dinitrochlorobenzene	A00	プラスチック製	溶解	溶解	一致	NT	○
	B: hexylcinnamic aldehyde	A00	プラスチック製	溶解	溶解	一致	安定	○
	C: 3-aminophenol	A00	プラスチック製	溶解	懸濁	不一致	安定	
	D: glutaraldehyde	ACE	プラスチック製	溶解	溶解	一致	NT	○
	E: cobalt chloride	DMSO	プラスチック製	溶解	2 施設が懸濁、 1 施設が溶解	不一致	NT	
	F: isoeugenol	A00	プラスチック製	溶解	溶解	一致	NT	○
	G: formaldehyde	ACE	プラスチック製	溶解	溶解	一致	NT	○
	H: dimethyl isophthalate	A00	プラスチック製	溶解	施設により差あり	不一致	NT	
	I: isopropanol	A00	プラスチック製	溶解	施設により差あり	不一致	NT	
	J: nickel sulfate	DMSO	プラスチック製	高濃度で 懸濁	2 施設が懸濁、 1 施設が溶解	不一致	NT	
	K: abietic acid	A00	プラスチック製	溶解、 ただし 3 回中 1 回 の調製に おいて高 濃度で懸 濁	懸濁	不一致	安定	
L: methyl salicylate	A00	プラスチック製	溶解	溶解	一致	NT	○	
第 2 実 験	B: hexylcinnamic aldehyde	A00	ガラス製	溶解	溶解	一致	安定	○
	E: cobalt chloride	DMSO	ガラス製	溶解	溶解	一致	NT	○
	J: nickel sulfate	DMSO	ガラス製	高濃度で 懸濁	全濃度で懸濁	一致	NT	
	M: lactic acid	DMSO	ガラス製	溶解	溶解	一致	NT	○
	N: potassium dichromate	DMSO	ガラス製	溶解	溶解	一致	NT	○

1) A00 : acetone/olive oil, ACE:acetone, DMSO:dimethyl sulfoxide

2) NT: not tested

3) 本安定性データはバリデーション後に実施され、バリデーションと同一の容器、同一の保管条件の結果ではない

表 4-1 各施設での個々の物質の判定結果（第 1 実験）

被験物質	感作性*		施設										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A: 2,4-dinitrochlorobenzene	+	Extreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B: hexylcinnamic aldehyde	+	Moderate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C: 3-aminophenol	+	Moderate	-		-						-		
D: glutaraldehyde	+	Extreme	+	+				-					
E: cobalt chloride	+	Strong					-		+		+		
F: isoeugenol	+	Moderate					+	+				+	
G: formaldehyde	+	Strong	+	+				-					
H: dimethyl isophthalate	-	Negative	-		-						-		
I: isopropanol	-	Negative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J: nickel sulfate	-	Negative					-		+		+		
K: abietic acid	+	Weak		+					+	+			
L: methyl salicylate	-	Negative			-						-		-

\*:LLNA法の評価結果に基づく感作性の判定

表 4-2 各施設での個々の物質の判定結果（第 2 実験）

被験物質	感作性*		施設							溶媒		
			11	12	13	14	15	16	17			
B: hexylcinnamic aldehyde	+	Moderate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	AOO
E: cobalt chloride	+	Strong	-		-	+					+	DMSO
J: nickel sulfate	-	Negative	-	-		-				-		DMSO
M: lactic acid	-	Negative	-		-				-	-		DMSO
N: potassium dichromate	+	Strong	+	+					+		+	DMSO

\*:LLNA法の評価結果に基づく感作性の判定

表 4-3 代替可能性の指標（第 1 実験の結果\*）

	被験物質数	感度	特異度	陽性予測度	陰性予測度	正確性
LLNA-DA 法 vs LLNA 法	12	87.5% (7/8)	75.0% (3/4)	87.5% (7/8)	75.0% (3/4)	83.3% (10/12)

\*：この被験物質について、施設毎の感作性評価について多数施設での判定結果をもとに計算

表5-1 : LLNA-DA 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)

chemicals	判 定 結 果			
	LLNA-DA	LLNA*	GMPT/BA*	HMT/HPTA*
2,4-dinitrochlorobenzene	+	+	-	ND
<i>p</i> -phenylenediamine	+	+	+	+
toluene 2,4-diisocyanate	+	+	ND	ND
glutaraldehyde	+	+	+	+
Potassium dichromate	+	+	+	+
phthalic anhydride	+	+	+	ND
trimellitic anhydride	+	+	ND	ND
formaldehyde	+	+	+	+
cinnamic aldehyde	+	+	+	+
isoeugenol	+	+	+	+
Cobalt chloride	+	+	+	+
eugenol	+	+	+	+
resorcinol	+	+	+	+
benzocaine	+	+/-	+	+
abietic acid	+	+	+	+
hexyl cinnamic aldehyde	+	+	+	ND
mercaptobenzethiazol	-	+	+	+
citral	+	+	+	+
hydroxycitronellal	+	+	+	+
imidazolidinyl urea	+	+	+	+
Sodium lauryl sulfate	+	+	-	-
NiSO <sub>4</sub>	-	-	+	+
benzalkonium chloride	+	-	-	+
propyl paraben	-	-	-	+/-
diethylphthalate	-	-	ND	ND
1-bromobutane	-	-	ND	ND
methylsalicylate	-	-	-	-
chlorobenzene	-	-	-	ND
lactic acid	-	-	-	ND
hexane	-	-	ND	-
isopropanol	-	-	-	ND

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

GMPT: Guinea pig maximization test, BA: Buehler assay

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

表5-2：LLNA-DA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-DA 試験 結果	+	2,4-dinitrochlorobenzene, p-phenylenediamine, toluene 2,4-diisocyanate, glutaraldehyde, K2Cr2O7, phthalic anhydride, trimellitic anhydride, formaldehyde, cinnamic aldehyde, isoeugenol, CoCl2, eugenol, resorcinol, abietic acid, hexylcinnamic aldehyde, citral, hydroxycitronellal, imidazolidinyl urea, Sodium lauryl sulfate	benzalkonium chloride
	-	mercaptobenzethiazol	NiSO4, propyl paraben, diethylphthalate, 1-bromobutane, methylsalicylate, chlorobenzene, lactic acid, hexane, isopropanol

+：感作性試験結果が陽性、-：感作性試験結果が陰性

	被験物質数*	感度	特異度	陽性予測度	陰性予測度	正確性
LLNA-DA法 vs LLNA法	30	95.0% (19/20)	90.0% (9/10)	95.0% (19/20)	90.0% (9/10)	93.3% (28/30)

\*：LLNA-DAで+、LLNAで+/-となった benzocaine は計算に入れていない。

追加資料 (080828)

表 4-3 代替可能性の指標 (第1実験の結果\*)

	被験物質数	感度	特異度	陽性予測度	陰性予測度	正確性
LLNA-DA 法 vs LLNA 法	12	87.5% (7/8)	75.0% (3/4)	87.5% (7/8)	75.0% (3/4)	83.3% (10/12)

\* : 個々の被験物質について、施設毎の感作性評価について多数施設での判定結果をもとに計算

表 4-3 改変 1 代替可能性の指標 (第1実験の結果\*)

	被験物質数	感度	特異度	陽性予測度	陰性予測度	正確性
LLNA-DA 法 vs LLNA 法	12	87.5% (7/8)	75.0% (3/4)	87.5% (7/8)	75.0% (3/4)	83.3% (10/12)

\* : 個々の被験物質について、重み付平均値での判定結果をもとに計算

表 4-3 改変 2 代替可能性の指標 (第1実験の結果\*)

	データ数	感度	特異度	陽性予測度	陰性予測度	正確性
LLNA-DA 法 vs LLNA 法	57	84.2% (32/38)	89.5% (17/19)	94.1% (32/34)	73.9% (17/23)	86.0% (49/57)

\* : 個々の被験物質について、施設毎の判定結果をもとに計算

施設毎に評価が分かれた物質

被験物質	陽性数	陰性数	多数決	重み付け	vivo
3-アミノフェノール	0	3	-	-	+
グルタルアルデヒド	2	1	+	+	+
フォルムアルデヒド	2	1	+	+	+
塩化コバルト (第1実験)	2	1	+	+	+
(第2実験)	2	2	+/-	+	+
硫酸ニッケル(第1実験)	2	1	+	+	-
(第2実験)	0	4	-	-	-

表 4-3 改変 3 代替可能性の指標 (第1&2実験の結果\*)

	被験物質数	感度	特異度	陽性予測度	陰性予測度	正確性
LLNA-DA 法 vs LLNA 法	14	88.9% (8/9)	100.0% (5/5)	100.0% (8/8)	83.3% (5/6)	92.9% (13/14)

\* : 個々の被験物質について、重み付平均値での判定結果をもとに計算

塩化コバルトおよび硫酸ニッケルは第2実験の結果を使用