

(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

平成 21 年 2 月 26 日

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 リサーチセンター)

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取り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

であると結論された。

A. 緒言

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いため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, 2002)。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。RI を用いない方法としては我が国の施設で開発された Bromodeoxyuridine の取り込みをみる方法 (BrdU 法) (Takeyoshi et al, 2003) および ATP 含量を測定する方法 (LLNA-DA 法) (Yamashita et al, 2005) が開発され、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、LLNA-DA 法については平成 16 年度より、LLNA-BrdU 法については平成 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。代替法学会のバリデーショ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、バリデーション研究を行った。今回、LLNA-BrdU 法についての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研究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。

なお、LLNA-DA 法に加えて、更に LLNA-BrdU 法について評価することとなった理由は、本試験法の一次評価において、LLNA-BrdU 法では、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、実際に試験を行う現場では試験法に複数の選択肢ができるのが望ましいと判断したことによる。

B. 評価方法

B-1) 評価組織

一次評価報告書に記載した。

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、今回の二次評価には関与しなかった。

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

二次評価に使用した資料について、以下に示した。

資料 1) (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

資料 2) LLNA-BrdU 法バリデーション研究 (第 1 実験) 報告書 (2007. 12. 24)

資料 3) LLNA-BrdU 法バリデーション研究 (第 2 実験) 報告書 (2008. 8. 6)

資料 4) 2008 年トキシコロジー学会発表原稿「LLNA-BrdU 法の施設間バリデーション研究 (第 2 次)」

資料 5) 2008 年免疫毒性学会発表原稿「非 RI による LLNA 法のバリデーション研究 (試験概要)」

会議の記録は以下のとおりである。

第 1 回 LLNA-BrdU 評価委員会 (2008. 10. 28) 議事録

第 2 回 LLNA-BrdU 評価委員会 (2008. 12. 9) 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、代替法学会における LLNA-BrdU 法バリデーション実行委員長である小島肇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-BrdU 法の施設内再現性、施設間再現性および LLNA を代替できる可能性について評価を行った。その際、今回のバリデーションの結果だけでなく、申請者である (財) 化学物質評価研究機構より新たに提供を受けた以下の資料を合わせて評価を行った。

申請者より提供された追加資料

追加資料 1) LLNA-BrdU 法の施設間バリデーション研究 (第 2 次) (2008. 10. 28)

追加資料 2) 非 RI による LLNA 法のバリデーション研究 (試験概要) (2008. 10. 28)

追加資料 3) 第 21 回動物実験代替法学会における LLNA-BrdU 法の Transferability に関する発表について (2008. 12. 9, 修正; 2008. 12. 15)

追加資料 4) LLNA-BrdU 法の判定基準について (2008. 12. 9, 修正; 2008. 12. 19)

追加資料 5) 判定基準に関する議論の推移 (2008. 12. 9)

追加資料 6) τ^2 を解析に用いなかった理由等 (2008. 12. 9, 修正; 2008. 12. 21)

B-6) バリデーショ参加者および参加施設名 (表 1)

バリデーショ実行委員は表 1 に示したように13名であり、計画の立案、実行、データ解析に関与した。バリデーショ実行委員の所属施設のうち、第1実験では9施設が、第2実験では7施設が実験を行った。なお、第2実験前に実施された予備実験は、第1実験に参加した9施設で行った。

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10種の被験物質を表2に示した。

C. バリデーショの評価

C-1) 被験物質の選択

第1実験では陽性物質8種(2,4-Dinitrochlorobenzene、Glutaraldehyde、Cobalt chloride、Formaldehyde、3-Aminophenol、Hexylcinnamic aldehyde、Isoeugenol、Abietic acid)、陰性物質4種(Dimethyl isophthalate、Isopropanol、Nickel sulfate、Methyl salicylate)が用いられた。第2実験では陽性物質6種(2,4-Dinitrochlorobenzene、Glutaraldehyde、Formaldehyde、Cinnamic aldehyde、Hexylcinnamic aldehyde、Eugenol)、陰性物質4種(Isopropanol、Lactic acid、Methyl salicylate、Nickel sulfate)が用いられた。陽性物質は、非常に強い、強い、中程度、弱い感作性物質の4種類を全て含むように選定された。これらの被験物質を用いることにより、評価委員会はLLNA-BrdU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。一方、これらの被験物質の数では、皮膚感作性を判断する能力、LLNA法の結果との対応性などを評価する上では数的に不十分と考えられたので、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。なお、試験法の一次評価の際に評価委員会は、バリデーショの被験物質としてFalse positiveとなることが知られている刺激性物質(例えば、塩化ベンザルコニウム、ラウリル硫酸ナトリウム)の評価を考慮する必要があるとしていたが、バリデーショの計画段階において選定されなかった。その理由は、被験物質選考グループにおいて、当初は刺激性物質を含める計画であったが、実験開始前に行われたLLNA変法に関するECVAM Workshop(Basketter, 2008)においてPerformance standardが提案されたことにより、Performance standardに含まれるReference chemicalを含める方が好ましいとの判断をしたためである。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Nickel sulfateは被験物質として選定された。

C-2) 被験物質の取り扱い

第1実験では、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たため、当初、調製から投与までの被験物質の安定性について留意する必要があると考えた。しかしながら、実験結果は施設間で大きなばらつきが認められ、バリデーショ実行委員会により試験法の改良がなされたことから、評価委員会では安定性に関する詳細な検討は行わなかった。一方、第2実験では、用時調製した被験物質溶液が投与に用いられたため、評価委員会は今回のバリデーショ目的を考慮のうえ、被験物質の安定性については検討する必要はないと判断した。

C-3) 1群の動物数

LLNA法における1群の動物数は、個体毎のデータを収集する場合には5匹、1群をまとめて測定する場合は4匹とOECDの安全性試験法ガイドラインに記載されている。先のLLNA-DA法のバリデーションの際には、実験規模の制約、動物愛護の観点から1群4匹を採用したが、施設間再現性は高かった。今回のLLNA-BrdU法では、試験法の申請者の実験手順書では1群5匹以上とされていた。それを評価委員会は一次評価において妥当と認めた。しかし、バリデーション実行委員会は実験規模の制約、動物愛護の観点を考慮し、1群4匹と設定し、申請者の同意を得た。なお、LLNA-BrdU法実験SOP ver1.01には「異常が認められないマウスが36匹に満たない場合は、群番号の大きい順に1群3匹とする。」とあり、一部、1群3匹も認められていた。評価委員会は、動物愛護の観点も考慮したバリデーション実行委員会の設定を尊重することとしたが、1群3匹はLLNA法との差が大きいため、実際にどの程度3匹で行われたかを確認することとした。第2実験において1群3匹で得た結果は、施設6・被験物質Bの低～高用量群の3群及び同じく施設6・被験物質Hの高用量群の計4群のみであり、第2実験全体の群数(126群)に占める割合は約3%に過ぎなかった。また、これらの実験結果は1群4匹の実験で得られたデータと同様の傾向を示したことから、総合判定の結果に影響を及ぼすものではなかったと考察することができ、バリデーション結果に与える影響は小さいと判断した。

C-4) 評価基準の妥当性

得られたSI値に基づき陽性、陰性を判断する評価基準について、評価委員会による試験法の一次評価の際には「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」としていた。これは提案者から示され、一次評価報告書に記載した基準であった。しかしながら、バリデーション実行委員会は「試験群毎に平均吸光度を求め、陰性対照群の吸光度に対する比(Stimulation Index, SI)を算出した後、各用量群の平均SI値を算出する。被験物質投与群のSI値の平均値が2以上の場合を陽性と判定する」と修正したので、この修正根拠について確認した。

その結果、評価基準を修正する際にバリデーション実行委員会が確認した点は以下のような事であった。

- ①LLNA原法が複数のエンドポイントの組合せではなく、被験物質投与群のSI値が3を超える場合を陽性とするという単一の基準で判断することから本法も汎用性を考慮すると単一の判定基準とする方が適切である。
- ②ばらつきを抑えるように配慮した標準操作手順書を作成、技術研修会を実施するため、「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」は削除可能であると判断できる。
- ③SI値の平均値が2を超える場合を陽性と判定する場合の諸統計値は、Dunnett検定を用いた場合に比較して若干劣るものの、比較的良好な値である。

これらの回答について検討した結果、評価委員会は上記の修正を妥当なものとして認め、了承した。なお、統計学的有意差のみでの評価は、媒体対照群のばらつきが小さい場合には偽陽性が出現しやすく、逆に媒体対照群のばらつきが大きい場合には偽陰性が出現しやすいという欠点について、検討の際に留意した。

C-5) エンドポイントの妥当性

評価委員会は一次評価報告書において「リンパ節細胞数など他の指標と比較して ELISA 法を用いることの優位性について説明が必要である」と記述し、説明を求めている。本試験に関わる ELISA 法は費用面、労力面でリンパ節細胞数の測定に劣るのではないかと懸念があったためである。これに対し、本試験法の提案者である武吉博士より「BrdU 測定の細胞数計測に対する優位性について」という回答文書が提出され、その中で、Ulrich らの論文の細胞計測値と武吉博士が ELISA 法を用いて測定した BrdU の測定値を、SI 値を用いて比較し、細胞数計測に比べ、BrdU 取り込み量を基にした方が、低濃度域から高い SI 値を示し、BrdU 取り込み量が細胞数に比べて感度が高いと考察された。これに対し、評価委員より「Ulrich らの用いた動物は雌性 BALB/c マウスで、武吉博士が用いた雌性 CBA/JN マウスとは異なる。LLNA における反応性は BALB/c は CBA/JN に比較して弱いことが推測できる。また、実施した施設も異なる。これでは、両者のデータを比較することができず、両者のデータの差は細胞数計測や BrdU 取り込みといった測定方法による違いではなく動物の感受性や施設による違いであるということを否定できない。したがって、BrdU 測定の細胞数計測に対する優位性はこのデータからは示すことはできないと考える。同じ施設で同じ系統の動物を用いて試験条件を同一にして試験を行い、測定部分だけを変えたデータが必要であると考え」とのコメントが出され、更なる説明が求められた。これに対して、武吉博士より細胞計測値と BrdU 法測定値を厳密に比較し、BrdU 法の方が高感度であることを示したデータは無いが、BrdU 法は細胞分裂の度合い（セル・ターンオーバー）を指標としており、原理的に見て細胞数測定よりも LLNA に近いと回答された。評価委員会は、この回答を了承した。

C-6) 試験成立基準

試験成立基準の設定の経緯を以下に示す。

第 1 実験では 12 被験物質を用い、9 施設でバリデーション研究が実施されたが、最終評価の指標となる SI 値は施設ごとに大きくばらついていた。この原因として、バリデーション実行委員会は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あると考察した。そして、この第 1 実験の結果を受けて、バリデーション実行委員会では試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、SI 値のばらつきを小さくすることが必要であろうと考えた。これを検証するため、第 1 実験に参加した 9 施設で希釈の影響の検討が、溶媒対照群の BrdU 取込み量を示す吸光度の測定によって行われた。その結果、3 施設では、溶媒対照群の吸光度が規定した範囲の下限未満となったが、そのうちの 1 施設では細胞浮遊液の調製に用いる生理食塩液の容量を少なくすることで溶媒群の吸光度が 0.145 となり、0.1~0.2 の範囲内に収めることができた。この 1 施設及び他の 6 施設も実測で 0.102~0.200 の範囲内に収めることができ、SI 値は安定していた。この検討結果を受け、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を作成し、10 物質を用いて 7 施設により第 2 実験を実施した。しかしながら、その結果は、溶媒対照群の BrdU 取込み量を示す吸光度として規定した 0.1~0.2 の範囲内に収めること等の事前に決めた実験の成立基準を満たすことができた実験は全体の約 6 割であった。この結果に対し、バリデーション実行委員会は、事前に定めた基準が厳しすぎたこと、並びに細胞浮遊液をさらに希釈することがばらつきを生むと考察した。そこで、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、結果の採用基準を緩和し、保存後に

希釈した試料での測定を行わないという基準での解析を行った。すなわち、溶媒対照群の BrdU 取り込み量を示す吸光度を 0.1~0.2 前後にするように事前に細胞浮遊液の最終容量を決めることとし、吸光度が基準値より大きくなった場合でも細胞浮遊液の希釈は行わないとした。さらに陽性対照物質 HCA の濃度 50%における SI 値が 2 以上を試験成立条件とした。その結果、SI 値の濃度依存性はごく一部を除いて認められ、概ね施設内差・施設間差は小さく、LLNA や他の動物実験との対応は良好となった。

評価委員会は、バリデーション研究報告書に記載された主な解析結果がコード開示後になされたことに対し、本来のバリデーションのあり方に則っておらず、重大な問題として受け止めたが、得られた試験結果（動物試験データでもある）を最大限有効に活用するという点を重視し、この解析結果を評価することとした。

試験成立基準設定の経過に関して、評価委員会は細胞浮遊液を希釈した時に倍率通りの結果が得られない理由を確認した。その結果、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との回答があった。また、バリデーション研究報告書に記載されている「事前に溶媒対照群の BrdU 取り込み量の平均吸光度を 0.1~0.2 前後にするための至適条件を検討し、細胞浮遊液の最終容量を決める」との試験条件に関し、評価委員会は、例えば吸光度 0.05~0.35 を試験成立の範囲とするなど、明確な試験成立範囲を提示しないと施設間でのばらつきの原因になるのではないかと懸念を表明した。これに対し、事前検討における溶媒対照群の BrdU 取り込み量を示す吸光度を 0.1~0.2 前後とすれば、本実験における吸光度は 0.05~0.35 に入るはずであるとの回答があった。そこで、最終的に本実験における溶媒対照群の BrdU 取り込み量の平均吸光度 0.05~0.35 および陽性対照物質 HCA の濃度 50%における SI 値が 2 以上を試験成立条件とするという結論に至った。

第 2 実験のデータ解析において希釈しないで評価するのであれば、第 1 実験は希釈しないで試験を実施した施設が 9 施設中 8 施設であり、第 1 実験のデータを無視することなく、第 1 実験と第 2 実験を合わせた解析を実施すべきではないかとの意見も示されたが、第 1 実験と第 2 実験では被験物質の調製法や細胞浮遊液の調製法が異なる条件で実施されたことから、合わせた解析は好ましくないと考えるとのバリデーション実行委員長の見解もあり、第 2 実験のデータのみで判断することとした。

C-7) バリデーションデータの除外

バリデーションデータの除外に関して、第 2 実験の Isopropanol の施設 1 と 6 の低濃度投与群において SI 値が 2 を超えているにもかかわらず陰性としている点が注目された。このようなデータを採用しないことについては、バリデーション前に規定していなかったことであるため、本来のバリデーションの進め方に反するからである。この件に関し評価委員会は、低濃度投与群ではばらつきが大きいために SI 値がわずかに 2 を超えたのみであり、中濃度投与群および高濃度投与群では陰性であったことから、バリデーション実行委員会が Isopropanol の施設 1 と 6 の結果を陰性としたことは、妥当と判断した。そして、このような場合以外は SI 値が 2 を超えた時、たとえわずかであっても陽性として評価されていることを確認した。

C-8) 再現性評価の指標

評価委員会は第 2 実験における施設内再現性、施設間再現性を評価する場合の指標として、LLNA-DA 法の時に用いられた τ^2 が今回も用いることができるのではないかとバリデーション実行委員会へ意見した。

これに対しバリデーション実行委員会は、 τ^2 は再現性評価の補助手段に過ぎず、LLNA-DA法の時もそのような位置づけであったと回答した。回答書には、「 τ^2 は対数 SI 値における施設間分散である。各施設の個々の実験から得られた SI 値（もしくは対数 SI 値）のみを用いて、分散を推定した場合、SI 値そのもののばらつきを考慮していないことになる。そこで各実験の対数 SI 値の分散を施設間と実験内に分解し、施設間に相当する分散を τ^2 とした。理想的には、 τ^2 のような指標に関して、事前に許容できる値を設定し、研究を行うべきであるが、そのようなことは LLNA-DA 法の研究でも行っていない。また、我々はその経験も少ない。さらに、この指標が適切に施設間差を評価しているかどうかについては十分な検討が必要であり、LLNA-DA 法の研究でもグラフを中心に考察を行い、 τ^2 はその補助指標として導入したに過ぎなかった」と記載されている。そして、参考として LLNA-BrdU 法の第 2 実験で求めた施設間差に関する τ^2 の結果が提示された。

C-9) 施設内再現性

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。バリデーション研究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。評価委員会は概ね再現性は良好であるが、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。

C-10) SI 値の施設間再現性

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、各濃度毎の SI 値の結果により検討した。施設 5 の 2,4-Dinitrochlorobenzene、Glutaraldehyde、Formaldehyde、Hexylcinnamic aldehyde 及び施設 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 と 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、評価委員会は陽性対照の 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。

また、バリデーション実行委員会より LLNA-BrdU 法の第 2 実験で求めた τ^2 の結果が提示されたので、評価委員会ではそれに基づいて補助的に施設間再現性を検討した。その結果、10 施設の 3 濃度段階における τ^2 の計算値 30 個のうち LLNA-DA 法における暫定的な基準である 0.182 を上回る値は 10 個、そのうち 4 個は 0.2~0.3 程度でそれほど大きな値では無かった。高濃度、中濃度、低濃度のいずれの濃度でも 0.182 を超える物質は 2,4-Dinitrochlorobenzene、Glutaraldehyde の 2 個であり、このうち 2,4-Dinitrochlorobenzene は 0.3 をわずかに上回る程度であった。1 物質 Glutaraldehyde を除いて概ね施設間再現性は良好であった。評価委員会は、バリデーション研究（第 2 実験）報告書の 25~26 ページの図からの視覚的な判定を主とし、施設間再現性評価の補助的手段として τ^2 を用いて検討し、LLNA-BrdU 法の施設間再現性は概ね良好であると考察した。なお、 τ^2 の暫定的な基準である 0.182 は、LLNA-DA 法の時に用いられた指標 $\exp(\tau^2)$ の 1.2 に該当する数値である。

C-11) 感作性の有無の判定の施設間再現性

LLNA-BrdU法の施設間再現性については、第2実験での各施設の感作性の有無の判定結果により検討した。施設間で食い違う判定をした被験物質は、7つの陽性物質（28試験）の内 Formaldehyde と3つの陰性物質（12試験）の内 Lactic acid で、それぞれ1施設が他の2施設と異なる判定を示したのみであったことから、評価委員会は感作性の有無の判定の施設間再現性は概ね良好であると考えた。

C-12) 技術移転性

技術移転性については、バリデーション研究報告書には記載されていないが、平成20年11月14日に開催された代替法学会の21回大会において、協和メディカルサービス株式会社の兵頭洋平先生と大阪大学の寒水孝司博士の共同研究「動物実験代替法のバリデーションにおけるtransferabilityの統計的評価法に関する研究」で解析結果の発表（兵頭ら，2008）があった。寒水博士はLLNA-BrdU法のバリデーション実行委員で解析の担当者である。その発表内容は、技術移転性を2段階で評価するものであり、第1段階では提案施設の背景データのばらつきから得た基準範囲に各施設がおさまるか否かで評価して、能力を有する（Competent）施設を選択し、第2段階ではCompetent施設のデータに施設と実験を変量とした二次元配置変量効果モデルを当てはめ、データのばらつきを、施設間分散、実験間分散、繰り返し誤差に分解し、データのばらつきに占める実験間分散の割合（級内相関係数）を求め、その値によって技術移転性を評価しようとするものであった。その結果は本LLNA-BrdU法は第1段階において7施設中3施設が限界値を超えたために技術移転性が低いというものであった。ただし、発表の際に「提案施設の分散がかなり小さいので技術移転性の評価が厳しくなった」と述べている。

このような報告が行われ、一方でバリデーション実行委員会の作成した報告書には技術移転性についての記載が無かったため、評価委員会はバリデーション実行委員会に対し、技術移転性に関する見解を求めた。これに対し、寒水博士と武吉博士の連名で「今回の結果は第一段階のCompetent施設選定に用いる提案施設の背景データのばらつきが極めて小さい（極めて再現性の良い結果が得られている）ため、結果として他の実験施設のばらつきを過大評価する結果となったものと考えられる。また、competent施設と判断された4施設における級内相関係数 ρ_i は0.06と極めて低い値となっており、試験法に習熟することにより、極めて再現性及び精度の高い試験法であり、高い施設間再現性が期待できる方法であると判断される。なお、今回の発表内容は研究段階の手法についてのものであり、現時点で本法を含めtransferability評価のGold standardといわれる手法がない現状では、本法の結果のみでtransferabilityの評価を行うことは適切ではないと考える。」との回答があった。バリデーション実行委員会からは、代替法学会における研究がバリデーション実行委員会と無関係の研究であるとの位置づけの表明、並びに技術移転性についてはバリデーション実行委員会で検討したことはなく、寒水博士と武吉博士による回答が本件に関する全てであるとのコメントがあった。これを受けた評価委員会は、技術移転性についてバリデーション実行委員会で検討されていない、技術移転性を評価する標準的手法が無い現状においては、LLNA-BrdU法が技術移転性のある試験法なのかどうかについては明確な評価はできないと結論した。しかしながら、評価委員会は寒水博士と武吉博士による回答にあるようにcompetent施設と判断された4施設における施設間再現性は極めて高く、試験法に習熟することにより、再現性及び精度の高い試験が可能となる事、並びに技術移転性を高めるための方法がバリデーション研究報告書や実験手順書で明示されている事などから、本試験法を実際に使用する場面において技術の移転に関して支障となることは無いと推察した。

C-13) 代替可能性

代替可能性を検討する際の陽性、陰性の判定法として、重み付き平均による方法並びに施設間で食い違う判定の場合に多数の結果を採用する方法（多数決）が考えられる。今回のバリデーション研究で採用されたのはLLNA-DA法の時と同様に重み付き平均による方法であった。評価委員会では両者ともそれぞれに意味のある代表値と考え、多数決による方法についても念のため検討した。その結果、両者の結果は一致しており、どちらを採用しても代替可能性の評価は同じであることを確認した。

LLNA-BrdU 法の LLNA 法に対する感度（sensitivity: 陽性物質を陽性と判定する能力）、特異性（specificity: 陰性物質を陰性と判定する能力）、陽性予測度（positive predictivity: 陽性との結果が得られた物質が陽性である割合）、陰性予測度（negative predictivity: 陰性との結果が得られた物質が陰性である割合）、一致度（accuracy: 判定結果が正確である割合）について、第2実験での感作性判定結果に基づき検討した。その結果は表4に示すとおり、感度、特異性、陽性予測度、陰性予測度、一致度はそれぞれ100、75.0、85.7、100、90.0%であり、いずれも高い値であった。

なお、LLNA-BrdU法とLLNA法で一致しなかった物質はNickel sulfateであった。この物質はLLNA法で陰性の報告が多いので今回の検討ではLLNA法陰性物質として分類している。LLNA法で陽性とのRyanら(2000)の報告も認められる。ヒトにおいては、感作性の報告が多く認められ、陽性物質として分類されている。動物の系統、適用法、エンドポイントをはじめ、どのような試験条件の場合に陽性が得られるのかは、今回のデータを含め、今後も注視していく必要がある。

評価委員会は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。そこで、LLNA法とLLNA-BrdU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-BrdU法による代替可能性の考察

申請者は30物質についての自家試験結果及び第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、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（GPMT/BT）やヒトでの皮膚感作性試験法（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-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-BrdU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-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、皮膚感作性の有無を評価する LLNA 法の代替として有用であると判断された。

参考文献

Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I., and Loveless, S. E. (1996). The local lymph node assay: a viable alternative to currently accepted skin sensitization tests. *Food Chem Toxicol* 34(10), 985-97.

Basketter, D., Cockshott, A., Corsini, E., Gerberick, G. F., Idehara, K., Kimber, I., Van Loveren, H., Matheson, J., Mehling, A., Omori, T., Rovida, C., Sozu, T., Takeyoshi, M., and Casati, S. (2008). An evaluation of performance standards and non-radioactive endpoints for the local lymph node assay. The report and recommendations of ECVAM Workshop 65. *Altern Lab Anim* 36(2), 243-57.

Kimber, I., Mitchell, J. A., and Griffin, A. C. (1986). Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. *Food Chem Toxicol* 24, 585-586.

OECD (2002) OECD guideline 429 Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, Adopted 24th April 2002. Takeyoshi, M., Sawaki, M., Yamasaki, K., and 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(2-3), 259-63.

Ryan C. A., Gerberick, G. F., Cruse, L. W., Basketter, D. A., Lea, L., Blaikie, L., Dearman, Warbrick, R. J., E. V. and Kimber, I. (2000). Activity of human contact allergens in the murine local lymph node assay. *Contact Dermatitis*. 2000 Aug;43(2):95-102.

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.

Yamashita, K., Idehara, K., Fukuda, N., Yamagishi, G., and Kawada, N. (2005). Development of a modified local lymph node assay using ATP measurement as an endpoint. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation* 11, 136-144.

兵頭洋平, 寒水孝司 (2008) 動物実験代替法のバリデーションにおける transferability の統計的評価法に関する研究, 日本動物実験代替法学会第 21 回大会要旨集, 158-159, 埼玉.

以上

表1 LLNA-BrdU バリデーション実行委員および所属施設

番号	氏名	所属	役割
1	大森 崇	京都大学大学院医学研究科医療統計学分野	データ管理
2	小島肇	国立医薬品食品衛生研究所薬理部	委員長
3	寒水孝司	大阪大学臨床医工学融合研究教育センター	割付とデータ管理・解析
4	吉村 功	東京理科大学工学部経営工学科	無任所
5	出原賢治	ダイセル化学工業（株）評価・解析センター	動物手配，実験
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	実験
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	実験
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	実験(第1実験のみ)，技術指導
9	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	実験
10	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	実験(第1実験のみ)
11	有馬和範	大正製薬（株）安全性研究所	実験
12	湯浅敦子	富士フイルム（株）CSR 推進部 環境・品質マネジメン	実験

		ト部素材試験センター	
13	牧栄二	(財) 食品農医薬品安全性評価センター	実験

表2 バリデーションで用いられた被験物質

物質名	LLNA 法における感作性の有無と程度	第1実験	第2実験
2,4-Dinitrochlorobenzene	非常に強い	○	○
Glutaraldehyde	非常に強い	○	○
Cobalt chloride	強い	○	
Formaldehyde	強い	○	○
3-Aminophenol	中程度	○	
Cinnamic aldehyde	中程度		○
Hexylcinnamic aldehyde	中程度	○	○
Isoeugenol	中程度	○	
Abietic acid	弱い	○	
Eugenol	弱い		○
Dimethyl isophthalate	無し	○	
Isopropanol	無し	○	○
Lactic acid	無し		○
Methyl salicylate	無し	○	○
Nickel sulfate	無し*	○	○

*: ヒトでは陽性と報告されている。

表3 各施設での個々の物質の判定結果（第2実験）

物質名	LLNA 法における感 作性の有無と程度	施設 1	施設 2	施設 3	施設 4	施設 5	施設 6	施設 7
2,4-Dinitrochlorobenzene	非常に強い	陽性						
Glutaraldehyde	非常に強い	陽性				陽性	陽性	
Formaldehyde	強い	陽性				陽性	陰性	
Cinnamic aldehyde	中程度		陽性		陽性	陽性		
Hexylcinnamic aldehyde	中程度	陽性		陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
Eugenol	弱い		陽性				陽性	陽性
Isopropanol	無し	陰性		陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
Lactic acid	無し			陰性	陰性			陽性
Methyl salicylate	無し	陰性	陰性	陰性				
Nickel sulfate	無し*			陽性	陽性			陽性

*: ヒトでは陽性と報告されている。

表4 代替可能性の指標（第2実験）

	N	感度	特異性	陽性予測度	陰性予測度	一致度
LLNA-BrdU 法*	10	100%	75.0%	85.7%	100%	90.0%
vs LLNA 法		(6/6)	(3/4)	(6/7)	(3/3)	(9/10)

*: 被験物資個々の感作性評価については、多数の施設での判定結果に基づいた。

表 5-1 : LLNA-BrdU 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)

chemical name	判 定 結 果			
	LLNA-BrdU	LLNA*	GMPT/BA*	HMT/HPTA*
2,4-dinitrochlorobenzene	+	+	+	+
<i>p</i> -phenylenediamine	+	+	+	+
glutaraldehyde	+	+	+	+
trimellitic anhydride	+	+	+	+
formaldehyde	+	+	+	+
cinnamic aldehyde	+	+	+	+
isoeugenol	+	+	+	+
eugenol	+	+	+	+
hexyl cinnamic aldehyde	+	+	+	ND
mercaptobenzethiazol	-	+	+	+
citral	+	+	+	+
hydroxycitronellal	-	+	+	+
<i>p</i> -Benzoquinone	+	+	ND	ND
diphencyclopropenone	+	+	ND	+
<i>m</i> -Aminophenol	+	+	+	+
linalool	-	+	ND	+
Isopropyl myristate	+	+	ND	-
<i>p</i> -Cloroaniline	+	+	+	ND
Nickel sulfate	+	-	+	+
Aniline	-	-	+	+
Glycerol	-	-	ND	-
Propylene glycol	-	-	ND	+
Dimethyl isophthalate	-	-	-	ND
diethylphthalate	-	-	ND	-
methylsalicylate	-	-	-	-
lactic acid	-	-	-	ND
hexane	-	-	ND	-
isopropanol	-	-	-	ND
3-(4-Isopropyl)isobutyraldehyde	-	-	ND	ND
2-Hydroxypropylmethacrylate	-	-	ND	+

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

C.A. Ryan et al., Contact Dermatitis. 43: 95-102, 2000

<http://www.inchem.org/documents/sids/sids/TLANA.pdf>

GMPT: Guinea pig maximization test, BA: Buehler assay

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

表 5-2 : LLNA-BrdU 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-BrdU 試験 結果	+	2,4-dinitrochlorobenzene p-phenylenediamine glutaraldehyde trimellitic anhydride formaldehyde cinnamic aldehyde isoeugenol eugenol hexyl cinnamic aldehyde citral p-Benzoquinone diphencyclopropenone m-Aminophenol Isopropyl myristate p-Chloroaniline	Nickel sulfate
	-	mercaptobenzethiazol linalool hydroxycitronellal	Aniline Glycerol Propylene glycol Dimethyl isophthalate diethylphthalate methylsalicylate lactic acid hexane isopropanol 3-(4-Isopropyl)isobutyraldehyde 2-Hydroxypropylmethacrylate

+: 感作性試験結果が陽性、-: 感作性試験結果が陰性

表 5 - 3 代替可能性の指標

	N	感度	特異性	陽性予測度	陰性予測度	一致度
LLNA-BrdU 法*	30	83%	92%	94%	79%	87%
vs LLNA 法		(15/18)	(11/12)	(15/16)	(11/14)	(26/30)