

皮膚感作性試験代替法 Local Lymph Node Assay (LLNA): BrdU-ELISA  
の判定基準の変更に関する評価会議報告

JaCVAM 評価会議

平成 24 年 (2012 年) 10 月 1 日

## JaCVAM 評価会議

吉田武美（日本毒性学会）：座長  
浅野哲秀（日本環境変異原学会）  
五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所）  
大島健幸（日本化学工業協会）  
小笠原弘道（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）  
小野寺博志（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）  
黒澤 努（日本動物実験代替法学会）  
杉山真理子（日本化粧品工業連合会）  
西川秋佳（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）  
長谷川隆一（独立行政法人 製品評価技術基盤機構）  
牧 栄二（日本免疫毒性学会）  
増田光輝（座長推薦）  
横関博雄（日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会）  
吉田 緑（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）  
吉村 功（座長推薦）  
渡部一人（日本製薬工業協会）

任期：平成 24 年 4 月 1 日～平成 26 年 3 月 31 日

以上

皮膚感作性試験代替法 LLNA: BrdU-ELISA については、既に JaCVAM 評価会議でその妥当性が評価されている<sup>1)</sup>。今回 LLNA: BrdU-ELISA の判定基準の変更に関する感作性試験評価委員会からの報告<sup>2)</sup>を受け、以下の 10 項目について評価したので報告する。

< 審議内容 >

1. 当該試験法は、どのような従来試験法を代替するものか。または、どのような毒性を評価あるいは予測するものか。

当該 Local Lymph Node Assay (LLNA): BrdU-ELISA は、化学物質等の皮膚感作性を評価するモルモット Maximization Test (GPMT)あるいは Buehler Test (BT)の代替試験法であるマウス LLNA の改良試験法である。従って、当該試験法の予測するところは、従来試験法の LLNA が予測する化学物質等の皮膚感作性である。

2. 当該試験法と従来試験法の間どのような科学的なつながりがあるか。

従来試験法は、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<sup>3</sup>H-methyl-thymidine (<sup>3</sup>H-TdR)の DNA への取込みを指標として検出する試験法である。当該試験法は、感作誘導によるリンパ節細胞の増殖を検出するという試験法の原理は従来試験法と同じであるが、放射性物質の<sup>3</sup>H-TdR の代わりに、bromodeoxyuridine (BrdU)の DNA への取込みを指標とし、BrdU 量を酵素免疫測定法 (ELISA) により吸光度として計測するものである。

3. 当該試験法とそのデータは、透明で独立な科学的評価を受けているか。

ICCVAM は、第三者評価委員会を組織し、JaCVAM が実施した当該試験法の検証試験<sup>3)</sup>で得られた 10 物質の試験成績を含む 43 物質の試験成績をレトロスペクティブに解析し、併せて従来試験法による結果と比較した。その解析において、当該試験法における皮膚感作性の判定基準としてカットオフ値 $\geq 1.6$ を使用することにより、従来試験法と同等の結果が得られることを示し、当該試験法の精度、感度および特異性を評価した<sup>4)</sup>。その組織および評価結果は、ICCVAM のホームページで公表されている。

また、我が国の LLNA: BrdU-ELISA 感作性試験評価委員会は、JaCVAM で実施された当該試験法の検証報告と上記 ICCVAM の評価結果を対比して評価した。

よって、当該試験法の判定基準の変更は、透明で独立な評価を受けていると判断される。

4. 当該試験法は、従来試験法の代替法として、どのような物質又は製品を評価することを目的としているか。

当該試験法は、皮膚外用剤として用いる医薬品、医療機器、化粧品、皮膚適用の医薬部外品、農薬等に含まれる物質又はそれらの製品に求められる皮膚感作性を評価する従来試験法の代替法としての使用を目的とする。

5. 当該試験法は、ハザード評価あるいはリスク評価のどちらに有用であるか。

当該試験法は、上記の物質又は製品における皮膚感作性のハザード評価に有用である。

6. 当該試験法は、目的とする物質又は製品の毒性を評価できるか。その場合、当該試験法の適用条件が明確になっているか。

当該試験法の妥当性を示すデータは、JaCVAM が検証試験に使用した 10 物質を含む 43 物質（化粧品、化成品、農薬、医薬品、殺菌消毒剤、合成中間体および原材料、食品添加物、香料、衛生材料および溶剤）の試験成績である。よって、当該試験法は、これらを含む物質又は製品の皮膚感作性を評価することができるといえる。

当該試験法においては、従来試験法と同様に過度の局所刺激性や明らかな全身毒性を示さない用量を最高用量とする。偽陰性を排除するため、皮膚感作性の陽性判定基準を JaCVAM で検証したカットオフ値  $\geq 2.0$  から  $\geq 1.6$  に変更した。この変更された判定基準においては、偽陽性を示す物質も存在するため、皮膚感作性陽性の最終判定は、被験物質に関する付加的情報（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性の証拠、タンパク結合性、分子量、関連化学物質の成績等）を考慮して行う必要がある。

適用限界は、従来試験法の LLNA と同様である。

7. 当該試験法はプロトコルの微細な変更に対して頑健であるか。

当該試験法は、従来試験法と原理的に同じであることから、当該試験法の精度並びに施設内および施設間再現性および頑健性は、従来試験法と同じであると考えられる。当該試験法は、BrdU 測定に市販の ELISA キットを使用することから、操作の変更（例えば、プレートの洗浄および乾燥、二次抗体の反応時間等）は測定値が変動する要因になりうる。しかし、実施に当たっては、ICCVAM の報告書を参照して施設毎に試験プロトコルを確立し、そのプロトコルを忠実に守ることが必要である。

8. 当該試験法の技術習得は、適切な訓練と経験を経ている担当者にとって容易なものであるか。試験法の実施に特殊な設備が必要か。

当該試験法は、適切な訓練を受け、経験を積んだ担当者にとってその技術習得は容易である。従来試験法に比べ、放射性取扱施設等の特殊な設備は必要ない。

9. 当該試験法は、従来試験法と比べて時間的経費的に優れているか。

従来試験法は、リンパ球の増殖反応を測定する方法として放射性物質（RI）を使用するため、特殊な実験施設や設備を必要とし、放射能管理、廃棄物の処理問題等、試験を実施する上で種々の制約があった。一方、当該試験法は、通常の実験設備が使用でき、また、RI を必要としないことより、特殊設備や廃棄物処理の管理が不要であり、時間的経費的に優れている。

10. 当該試験法は、動物福祉の観点及び科学的見地から、目的とする物質又は製品の毒性を評価する代替法として、行政上利用することは可能か。

当該試験法は、動物を用いない代替試験法ではない。しかし、GPMT 等他の皮膚感作性試験法と比較して、動物に与えるストレスは少なく、苦痛の軽減という点で優れている。皮膚外用剤として用いる医薬品、医療機器、化粧品、皮膚適用の医薬部外品、農薬等に含まれる物質又はそれらの製品の皮膚感作性を予測する当該試験法は、判定基準のカットオフ値を下げることにより偽陰性の排除が可能になるとともに、RI を使用せずとも従来試験法と同等の結果が得られることから、行政上利用することは可能である。

参考文献

- 1) 皮膚感作性試験 (LLNA : BrdU 法) の評価会議報告書、JaCVAM 評価会議 (平成 22 年 5 月、平成 23 年 4 月改定)
- 2) 皮膚感作性試験代替法 Local Lymph Node Assay (LLNA): BrdU-ELISA の第三者評価報告 (平成 24 年 7 月)
- 3) 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)
- 4) 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.