

Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA、単群局所リンパ節試験*)の第三者評価報告書
(* 試験法の邦文名は、提案名称)

平成 23 年 11 月 19 日

皮膚感作性試験代替法評価委員会

委員長 金澤由基子 (医薬品機構)

委員 牧栄二 (元・安評センター)

皮膚感作性試験法としては、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での接触感作性のリスクを動物で予測する試験法としてモルモットを用いる Maximization Test (GPMT) 法があり、その試験成績は皮膚外用剤の臨床での皮膚感作性と良い相関性を有することが示されている。また、GPMT の代替試験法として、マウスを用いる Local Lymph Node Assay (LLNA, 局所リンパ節試験)があり、その予測率は、GPMT に劣らないとされ、国際的に認知されている。両者の違いは、GPMT が感作誘発期の皮膚反応を肉眼的に判定するのに対して、LLNA は感作に基づく耳介リンパ節の細胞増殖反応を ^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ところにある。また、2010 年に改定された OECD テストガイドライン(TG) 429 には、LLNA と Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA)が記載されている。rLLNA は、その手法において元の LLNA の試験法を踏襲するものであり、異なる点は、LLNA が 3 用量の被験物質で検討されるのに対し、rLLNA は 1 用量の被験物質で皮膚感作性を検討するところにある。また、rLLNA は、動物福祉の 3R の原則（動物実験代替法の活用 (replacement)、使用動物数の削減 (reduction)、苦痛の軽減 (refinement)) に沿ったものであり、使用動物数においては、元の LLNA と比較して、最大^(注解)40%まで動物数が削減される（注解：陽性対照群が設定しない場合）。

本報告では、本邦において未だ検証されていない rLLNA の試験法について、その有用性と限界に関する ICCVAM の勧告（2008）を基に編纂を行う。

1. 試験法

1-1 原理

rLLNA の試験法の原理は、LLNA の試験法の原理と同じである。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 および rLLNA 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、 ^3H -TdR の核酸成分への取り込みを指標として検出する。LLNA と rLLNA の試験法における唯一の違いは、被験物質の試験に用いる用量数にある。LLNA においては、最大溶解度で過度の局所刺激性を示さず、更には、全身毒性を示さない濃度を最高用量とし、各被験物質に対して少なくとも 3 用量が試験に使用されるが、rLLNA においては、LLNA で示す最高用量の 1 用量のみが試験に使用される。

1-2 試験手順および判定

1-2-1 試験手順

8-12 週齢の CBA/J あるいは CBA/Ca 系の雌マウスを用い、マウスの両耳に被験物質を各々 25 μL 、3 日間塗布し、その 3 日後に ^3H -TdR を尾静脈投与する。その 5 時間後に耳介

リンパ節を摘出し、その耳介リンパ節細胞中に取り込まれた $^3\text{H-TdR}$ 量を測定する。

1-2-2 判定

溶媒対照群に対する被験物質投与群の $^3\text{H-TdR}$ 取り込み量の比 (Stimulation index: SI) が 3 倍を越えた際に、陽性と判定する。判定においては、陰性対照群および陽性対照群の反応も考慮する。LLNA においては、結果が明確でない場合、用量相関性の強さ、統計学的有意差も考慮されるが、rLLNA では実施できない。

2. rLLNA の精度

潜在的に皮膚感作性を有する物質を確認するための rLLNA の精度は、LLNA で実施された 11 施設の試験成績を基に、retrospective に評価された。

LLNA では 471 被験物質のうち、318 被験物質が陽性であり、153 被験物質が陰性であった。或る被験物質が同じ溶媒で 1 回以上試験されている場合を 1 試験として数えると、465 被験物質が評価の対象となり、その中の 315 被験物質が感作性として分類され、150 被験物質が非感作性として分類された。6 被験物質は、LLNA において最高用量以外の用量の SI 値が 3 以上を示したため陽性と評価された。換言すれば、rLLNA においては偽陰性となる。rLLNA は、最高用量でのみ試験され、評価されるため、これら 6 被験物質 (2-Methyl-2H-isothiazole-3-one、C19-azlactone、Azithromycin、Camphorquinone、Nickel sulfate および Non-ionic surfactant 2) は、LLNA と比較すると、非感作性物質として位置づけられた。

3. rLLNA の施設間再現性

rLLNA の施設間再現性は、2 或いは 3 施設において、次の 5 被験物質について同じ溶媒を用いて個々に試験され、LLNA と比較して評価された。

- Dinitrochlorobenzene (DNCB)
- Hexyl cinnamic aldehyde (HCA)
- Linalool alcohol
- Methyl salicylate
- Potassium dichromate

各施設における全ての試験は、DNCB と potassium dichromate を感作性物質として、methyl salicylate を非感作性物質として分類した (一致率 100%)。

HCA と linalool alcohol は、2 施設で試験され、LLNA 試験では感作性物質として分類され、rLLNA では非感作性物質として分類された。これら 2 試験法における一致しない結果を検証してみると、試験された最高用量での両試験における結果の違いによるものであった。しかしながら、rLLNA と LLNA は同一の試験計画書を使用しており、両者の精度を評価するために使用した一連のデータは類似しているため、rLLNA の施設内および施設間信頼性は、LLNA に類似するものと考えられる。

4. 試験法の有用性と限界

rLLNA の科学的な価値は、十分に評価されており、最新の ICCVAM が推奨した LLNA 試験計画書 (ICCVAM 2008a) に準拠して行われたとき、rLLNA の成績は、用量-反応情報を必要としない場合には、皮膚感作性物質と非感作性物質を区別するに十分であると、ICCVAM は結論している。

- LLNA と比較すると、rLLNA は、各々の試験に対して最大 40%まで動物数を減らすことができる。
- 化学物質や製品のアレルギー性接触皮膚炎 (ACD) の潜在性を調べるために LLNA を行う前に、先ず rLLNA を実施することを ICCVAM は勧めている。
 - rLLNA において陽性と評価された物質は、感作性物質として分類できる。
 - 用量-反応情報が必要な場合、用量段階を持つ LLNA において試験されなければならない。
 - ACD を誘発すると考えられる物質については、rLLNA よりむしろ LLNA を最初から実施して評価すべきである。
- LLNA と比較して rLLNA に 1.9% (6/318)の偽陰性の結果を示す可能性がある。
 - この情報は rLLNA の結果を評価するとき考慮されるべきであり、陰性の結果は常に補足情報 (例えば、高用量での反応低下の可能性、類似物質による試験結果、タンパク結合活性、分子量、その他の試験データ) を統合して評価することを促すべきである。
 - もし偽陰性の結果が示唆されるならば、LLNA 或いは他の公認の皮膚感作性試験法による確認試験が考慮されるべきである。

5. 試験計画書

rLLNA は、ICCVAM が推奨する最新の LLNA 試験計画書に従って実施されることを ICCVAM は勧めている。その重要な点は、以下の通りである。

- 使用される最高濃度は、過度の局所刺激性や明白な全身毒性を示さない、最大溶解濃度であること。
- 動物の成績は、個々に収集されること。
 - これは、偽陰性や偽陽性の結果を引き起こす外れ値の識別や棄却に備えるためである。
 - 動物の成績を個々に収集することは (合算して得た成績と比較して)、被験物質の反応が溶媒対照群の反応と有意に異なっているか否かを定めるための統計解析に備えるためである。
- 投与群には最低 4 匹の動物が使用されること。
 - OECD TG 429 の LLNA では、投与群には少なくとも 4 匹の動物が必要であるとし

ている。

- 統計解析によれば、投与群の動物数が 4 匹でも、統計解析の結果に有意な影響はないようである。
- 陽性対照物質は、試験毎に使用されること。
 - これは、この試験の実施手順や試験系の全てが、陽性反応を生ずるために適切に反応しているかを明らかにする。

6. 今後の検討事項

ICCVAM は、潜在的な皮膚感作性を確認するための rLLNA を更に特徴付け、その有用性と応用性を高めるために下記の追加の検討を推奨している。

- 今回の評価において、LLNA と比較し、rLLNA に偽陰性の結果を生じさせた 6 被験物質の異常な用量反応の原因を明らかにするために努力すること。
 - この情報は、LLNA と比較して rLLNA の精度を高める方法を見つけるために役立つ。
 - 市販後調査や職業上の暴露に関する情報も含め、LLNA において異常な用量反応を示すこれらの物質やその他の物質のモルモットやヒトにおける成績も一緒に含めて考えるよう努めること。
- LLNA および rLLNA の試験で、動物の成績は個々に収集すること。
 - 個別に集めれば外れ値があった場合、棄却することができる。
- 試験法の精度を低下させずに投与群当たりの動物数を減らすため、動物からの成績は個々に集められ、解析されるべきである。
 - ICCVAM が推奨する最新の LLNA 試験計画書には、そのような判断のために必要な統計解析手法が組み込まれている。
 - また、最新の試験計画書には、一緒に設定する陽性対照群の動物数を、その施設の陽性対照の背景データを評価することにより、減らすことができるか決めるためのガイダンスも盛り込まれている。

7. rLLNA の試験計画書

Day 1 – 3 : 投与毎に 4 匹のマウスの各々の両耳の背面に適当な溶媒を用いた被験物質 (LLNA で試験される最高用量) 或いは対照物質の 25 μ L を塗布する。

↓

Day 4 – 5 : 無処置

↓

Day 6 : 各々の動物の尾静脈に 20 μ Ci ^3H -TdR 若しくは 2 μ Ci ^{125}I -iododeoxyuridine と 10^{-5} M fluorodeoxyuridine を投与する。

↓

5時間後：耳介リンパ節を個別に摘出し、押しつぶして単離細胞懸濁液を調製する。

↓

単離細胞懸濁液をリン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄し、4°Cで18時間、5% trichloroacetic acid でDNAを沈殿させる。

↓

Trichloroacetic acid にペレットを再懸濁し、³H測定にはシンチレーション溶液を加え、¹²⁵I測定には再懸濁したペレットをガンマー線測定チューブに加え、放射能測定に備える。

↓

放射能測定：対照群と処置群の平均 dpm（毎分崩壊数）を測定する。

取り込み量（Stimulation index: SI）は、次の式より算出；

処置群の平均 dpm / 対照群の平均 dpm

SI ≥ 3：被験物質を感作性物質として分類

SI < 3：被験物質を非感作性物質として分類

8. まとめ

- rLLNA は、最新の ICCVAM が推奨する LLNA 試験計画書に準拠して行われるとき、皮膚感作性物質と非感作性物質を十分に区別できると、ICCVAM は結論している。
- 化学物質や製品の ACD の潜在性を調べるために、LLNA を行う前に rLLNA を実施することを ICCVAM は勧めている。
- LLNA と比較して、rLLNA では使用動物数を各試験当たり最大 40% まで削減できる。
- rLLNA には 1.9% (6/318) の偽陰性の結果を示す可能性がある。もし偽陰性の結果が示唆されるならば、LLNA 或いは他の公認の皮膚感作性試験法による確認試験を考慮すべきである。
- 用量-反応情報が必要な場合は、用量段階を持つ LLNA において試験されなければならない。

9. rLLNA 編纂委員会としての結論

- rLLNA は、化学物質の皮膚感作性を評価することが可能な試験方法である。

- rLLNA の結果が $2 < SI < 3$ の場合、その判定に当たっては、被験物質に関する情報（例えば、最高用量での反応低下の可能性、タンパク結合性、類似化合物における皮膚感作性など）に基づいて慎重に評価する必要がある。
- rLLNA の結果が $SI \geq 3$ であれば、これ以上の皮膚感作性試験は不要である。
- LLNA や GPMT により非感作性物質と評価された原薬（化学物質）で製造された製品の評価には、rLLNA のみの実施でよい。
- rLLNA の邦文名として「単群局所リンパ節試験」を提案する。

10. 文献

ICCVAM 1999. The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemical/Compounds. NIH Publication No. 99-4494. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences.

Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf

ICCVAM 2008a. Recommended Performance Standards. Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication No. 07-4518. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available: <http://iccvam.niehs.nih.gov/>

ICCVAM 2008b. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available: <http://iccvam.niehs.nih.gov/>

Kimber I, Deaman RJ, Betts CJ, Gerberick GF, Ryan CA, Kem PS, et al. 2006. The local lymph node assay and skin sensitization: a cut-down screen to reduce animal requirements? Contact Dermatitis. 54: 181-185

OECD 2002: Test guideline 429. Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, adopted April 24, 2002. In: OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Paris: OECD. Available: <http://lysander.sourceoecd.org/vl=1706714/cl=11/nw=1/rpsv/cw/vhosts/oecdjournals/1607310x/v1n4/contp1-1.htm>

OECD 2010: Test guideline 429. Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, adopted July 22, 2010. In: OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Available:

<http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD-TG429-2010.pdf>

Wind M, Matheson J, Jacobs A, Tice R, Stokes W: ICCVAM Test Method Recommendations for the Reduced LLNA (rLLNA): An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products. Available:

<http://ICCVAM.niehs.nih.gov/meetings/SOT09/posters/Wind.pdf>