

添付資料 5

代替試験法申請書

皮膚感作性試験：LLNA-DA 法

2004年 1月 15日

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式会社

評価解析センター

出原賢治、山下邦彦、福田徳雄、山岸学、河田直紀

目次

Abbreviations -----	ii
緒言 -----	iii
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-----	1
資料 2) LLNA に関する資料 -----	2
資料 3) LLNA-DA の原理 -----	9
資料 4) LLNA-DA のプロトコール -----	20
資料 5) LLNA-DA で評価した被験物質リスト -----	29
資料 6) LLNA-DA 試験結果 -----	32
資料 7) LLNA-DA の感度、特異性、予測性、精度 -----	64
資料 8) LLNA-DA の特徴 -----	68
資料 9) 試験法のバリデーションとその QC に関する資料 -----	72
資料 10) その他、データ解析上有用な資料（生データ等） -----	73
資料 11) 論文（または、学会発表資料&印刷中の論文原稿） -----	74
資料 12) 提案者の研究歴および専門性を示す資料 -----	75

Abbreviations

AMR	ATP Monitoring Reagent
AOO	Acetone-Olive Oil (4:1, v/v)
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
BA	Beuhler Assay
BrdU	Bromodeoxyuridine
BzC	Benzalkonium chloride
DMF	<i>N,N</i> -Dimethyl formamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNCB	2,4-Dinitrochlorobenzene
DPM	Disintegrations Per Minute
EPA	United States Environmental Protection Agency
FCA	Freund's Complete Adjuvant
FDA	Food and Drug Administration
GPMT	Guinea Pig Maximization Test
HCA	Hexylcinnamic aldehyde
HMT	Human Maximization Test
HPTA	Human Patch Test Allergen
³ H-TdR	³ H-methyl thymidine
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
¹²⁵ IU	¹²⁵ I-iododeoxyuridine
IL-2	Interleukin Type 2
LLNA	Murine Local Lymph Node Assay
LN	Lymph Node
LLNA-DA	modified LLNA of Daicel based on ATP content
L-L法	Luciferin-Luciferase method
MBT	2-Mercaptobenzothiazol
MEK	Methyl ethyl ketone
NRR	Nucleotide Releasing Reagent
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OSHA	Occupational Safety & Health Administration
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PG	Propylene glycol
pPDA	<i>p</i> -Phenylenediamine
RI	Radioisotope
RLU	Relative Light Unit
SDS	Sodium lauryl sulfate
SI	Stimulation Index
TMA	Trimellitic anhydride

緒言

化学物質の皮膚感作性による接触過敏症は、重要な問題として注目を集めている。多くの化学物質を取り扱う弊社においても、皮膚感作性のリスク評価は重要な項目の一つとなっている。リスク評価を適切に行うためにも、化学物質の持つ感作性ポテンシャルを検出する試験系の重要性はますます高まっている。

皮膚感作性の試験としては、guinea pig を用いた試験法が最も一般的に用いられてきており、OECD ガイドラインに記載されている試験法としては 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評価することにより、guinea pig に対する化学物質の感作性の有無を検出できる。長年にわたり多くの機関で用いられてきた実績があり、蓄積データも豊富である。しかしながら、試験に 5 週間を要する事に加え、作業負荷やコストの面から、弊社で取り扱う膨大な化学物質すべてについて実施する事は困難であった。同時に動物に対する負荷も比較的高いといえる。

1986 年に I. Kimber らにより提案された Local lymph node assay (LLNA) は、感作誘導期における局所リンパ節中の細胞増殖反応を指標としたマウスを用いる皮膚感作性試験法である。既に ICCVAM による代替法評価を経て、独立した試験法として OECD ガイドラインに受け入れられた（2002 年）。さらに EPA、FDA、OHSA でも独立した試験法として受け入れられている。

LLNA は guinea pig を用いる試験法と比較すると、以下のような多くのメリットがある。

- ・ 試験期間が約 1 週間と短い
- ・ 結果が定量的である
- ・ 用量依存性の評価が出来る
- ・ 動物へのストレスを低減できる
- ・ 使用動物数の大幅な削減が可能
- ・ コストの削減が可能
- ・ 着色した被験物質も評価できる
- ・ マウスは免疫に関する研究がより進んでいる
- ・ 感作誘導期の評価であるため、将来的にメカニズムの面からの研究や試験法の進歩が期待できる

試験期間が短く低コストである（作業負荷も少ない）ことから、LLNA はより実用的である。また、3 R については、Replacement には該当しないものの、動物使用数の削減が可能であり（Reduction）、試験期間が短く、長時間の閉塞貼付や GPMT で用いる Freund's Complete Adjuvant を使用しないなど、動物の苦痛を大幅に削減できるため（Refinement）、LLNA の普及は動物福祉の観点からも意義深いといえる。欧米では LLNA による感作性データが蓄積しつつある。化学物質のポテンシャルを定量的かつ用量依存的に評価できるこ

とは、リスクアセスメントへの利用の点でも好ましい。

しかしながら、LLNAにおける細胞増殖反応の検出は放射性同位元素（RI）の取り込みを基礎としており、操作上、RIのマウスへの尾静脈投与を必要とする。このため、主に放射性廃棄物を生じる問題から、簡便に使用できる方法とは言えない。このことは、日本においてLLNAが広範に普及する事を妨げている一因であると思われる。既に、RIを使用せずに細胞増殖を検出する改変法として、BrdUの取り込みやIL-2の産生量をELISAで測定する方法をはじめ幾つかの報告があり、OECDガイドラインでも、充分な科学的根拠があればRI法以外の指標を用いることが出来るとしている。残念ながら、充分にバリデートされ、公的に認められた非RI法は今のところまだ無い。また、報告されている方法は検出感度がLLNAに対し低いように思われる。

弊社では、LLNAと同等の感度を持ち、かつ簡便で実用性のある非RI-LLNAの開発を目的として検討した。その結果、感作誘導期のリンパ節に含まれるATP量を指標とすることにより、非常に簡便な非RI-LLNA法(LLNA-DA)を開発した。LLNAで既に評価されている17検体について評価したところ、LLNA-DAによる結果はLLNAの結果とよく一致し、さらにEC₅₀が概ね一致することから、ほぼ同等の感度を持つ事が期待できるに至った。LLNA-DAは、guinea pigを用いる試験法に対するLLNAのメリットをほぼ同様に持っている。即ち、主に実用性、動物福祉、リスクアセスメントへの利用の点で優れている。実験操作はLLNAより更に簡便であり、RIを使用しないことから多くの施設で容易に実施できるものと思われる。したがって、guinea pigを用いる試験法からの移行をより促進できると期待される。

LLNAの代替法として、LLNA-DAを提案したい。

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

—代替しようとする試験法の名称

Local Lymph Node Assay (LLNA) の代替法として LLNA-DA (modified LLNA of Daicel based on ATP content) を提案する。

資料 2) LLNA に関する資料

—代替しようとする *in vivo* 試験法に関する資料（プロトコール、再現性、特異性、予測性についての記述を含む）

2-1 Local lymph node assay (LLNA)

LLNA は、マウスを用いて化学物質の感作性を評価する試験方法であり、1986 年に Kimber らにより提案された(1)(2)(3)。1992 年には、皮膚感作性のスクリーニングテストとして OECD ガイドライン 406 に記載され、その後、多くの研究者により検証が行われた。1998 年には G. F. Gerberick、I. Kimber、D. A. Basketter の提案に基づき ICCVAM による評価が行われ、その結果、LLNA は皮膚感作性評価のための独立した代替法として認められた(4)(5)(6)(7)。ただし、ICCVAM は提案されたプロトコールに幾つかの改善を推奨している（リンパ節のプールは群ごとではなく個体ごとに行うこと、陽性対照を設けること、判定にあたって用量依存性および統計的有意差を考慮すること）。ICCVAM の推奨を基礎として、EPA、FDA、OSHA により、LLNA は Guinea pig maximization test (GPMT) の代替法として受け入れられた(5)(8)(9)。2002 年には OECD ガイドライン 429 に採用され、LLNA は充分にバリデートされ、皮膚感作性試験の独立した代替法であるとされている(10)。

LLNA は皮膚感作導入期における反応、即ち化学物質との接触により引き起こされる所属リンパ節のリンパ球増殖を指標として評価する点が特徴的である。従って、guinea pig を用いる試験のような感作誘発期の評価を必要としない。そのため、試験期間を大幅に短縮する事が可能である。また、広範に実施してきた GPMT で使用されるアジュバント (Freund's Complete Adjuvant、FCA) は LLNA では必要としない事に加え、試験期間が短く、長時間にわたる被験物質貼付を避けられるなど、動物の受けるストレスと苦痛はかなり低減される。さらに 1 検体の評価に必要な動物数も削減できる可能性があり、LLNA の普及は動物福祉の観点からも意義深いと考えられる。guinea pig を用いる試験と比較すると、試験に掛かるコストも大幅に削減できる事が見込まれる。

リンパ球増殖の評価は、放射性元素 (RI) で標識された核酸構成成分の取り込み量をエンドポイントとして行われる。被験物質をマウス耳介に 3 日間連続で塗布し、6 日目に ^3H -methyl thymidine または ^{125}I -iododeoxyuridine を静脈内投与、5 時間後に摘出したリンパ節より調製されたリンパ球懸濁液の放射線強度を細胞増殖の指標としている。被験物質投与動物群における放射線強度の溶媒コントロール群に対する比を SI 値 (Stimulation Index) とし、SI 値が 3 を超えるとき陽性と判定される。従来の試験法と比較して、より定量的かつ客観的な結果を得ることが出来る。また、リンパ球の増殖は接触した感作性物質の量および感作性能と相關しておこるため、用量依存性がある。

RI の動物への使用は、特に廃棄物の問題があるため簡便に使用できる方法とは言い難い。OECD ガイドライン 429 は、充分な科学的根拠があるならば、細胞増殖の指標としてこれ

以外のエンドポイントを使用できる可能性があるとしており、RI 法を唯一のエンドポイントとして限定するものではない。既に、非 RI の代替エンドポイントとして、BrdU の取り込み、IL-2 の產生、PCNA 発現量の測定等が提案されている(11)(12)(13)。しかしながら、充分にバリデートされ、公的に認められた非 RI 法はまだ無いのが現状である。

LLNA の細胞増殖活性には用量依存性があるため、SI 値が 3 になると予測される濃度を外挿により求める事が出来る (EC_3)。 EC_3 は下記の等式で求められる。

$$EC_3 = c + [(3-d) / (b-d)] \times (a-c)$$

SI 値 = 3 となる直後および直前の 2 点（用量、SI 値）をそれぞれ (a, b) 、 (c, d) とする。

EC_3 の値は被験物質の感作性能が強いほど低い値を示す。D. A. Basketter らは、ヒトにおける感作性物質を感作性強度により 5 つのランクに分類し、その EC_3 との比較を行った。その結果、感作性強度と EC_3 とは非常によく相関する事が示された(14)。この結果から、LLNA は化学物質のリスクアセスメントにも応用できるものと期待される。

2-2 LLNA のプロトコール

主に OECD ガイドライン 429 の記述を基に、以下に記述する(10)(9)(15)。

2-2-1 使用動物

LLNA にはマウスを用いる。CBA/Ca または CBA/J の出産および妊娠経歴のない雌で試験開始時に 8~12 週齢のものを使用する。室温 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$)、湿度 30~70%、12 時間明暗サイクルの条件下で飼育を行い、餌および水は自由に摂取させる。5 日以上の馴化の後、皮膚に異常が認められない動物を試験に供する。

2-2-2 投与群の設定

1 群 4 匹以上とし、被験物質あたり 3 用量以上を設定する。個々の動物についてデータを取る場合 1 群を 5 匹以上とする。推奨されている投与用量は、100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%・の系列から、連続した 3 用量以上である。被験物質に急性毒性あるいは皮膚刺激性がある場合は、それを考慮して最高用量を設定する。

使用溶媒 (Vehicle) は被験物質の溶解性を考慮し、溶液または懸濁液として最も高濃度で投与可能な Vehicle を選択する。OECD で推奨されている Vehicle の優先順位は、Acetone/olive oil (4:1 v/v、AOO)、Dimethylformamide (DMF)、Methyl ethyl ketone (MEK)、Propylene glycol (PG)、Dimethyl sulfoxide (DMSO) である。ただし、他の Vehicle も充分な科学的根拠があれば使用可能とされている。

陰性対照群として、試験に使用した Vehicle の投与群を設ける。また、試験の信頼性を確保するため、陽性対照群を設ける。陽性対照物質は、LLNA において陽性となる事が確認されている物質を用い、SI 値が 3 を超える濃度で使用する。OECD では Hexyl

cinnamic aldehyde (HCA、CAS No: 101-86-0)、Mercaptobenzothiazol (MBT、CAS No: 149-30-4) を推奨している。

陰性対照群および陽性対照群は試験群と同じ操作で並行して行う。

2-2-3 投与日程

- Day 1 :

マウスの体重を個別に測定し、マーキングする（耳介へのマーキングは避ける）。各濃度に調製した被験物質溶液または懸濁液、およびVehicle、陽性対照物質溶液を、マウスの両耳介背面に滴下し開放曝露させる。滴下量は、耳介あたり $25 \mu\text{L}$ ($50 \mu\text{L}/\text{animal}$) とする。

- Day 2、Day 3 :

Day 1と同じ開放曝露を行う。

- Day 4、Day 5

特に処置しない。

- Day 6 :

マウスの体重を個別に測定する。

^3H -methyl thymidine (^3H -TdR) のリン酸バッファー (PBS) 溶液 $250 \mu\text{L}$ ($20 \mu\text{Ci}$) または ^{125}I -iododeoxyuridine (^{125}IU) および 10^{-5}M FluorodeoxyuridineのPBS溶液 $250 \mu\text{L}$ ($2 \mu\text{Ci}$) を尾静注により全個体に投与する。

5時間後に、マウスを安樂死せしめ、両耳下リンパ節を摘出、PBS中にプールする。リンパ節は投与群ごとに纏める（群ごとにデータを取る場合）か、もしくは個体ごとに纏める（個体ごとにデータを取る場合）。

2-2-4 細胞懸濁液の調製

プールされたリンパ節を $200 \mu\text{m}$ 金属製メッシュ上で穩やかに押しつぶし、細胞懸濁液を調製する。充分量の PBS で 2 回洗浄したのち、5%Trichloroacetic acid (TCA) 中で 4°C 18 時間静置させ細胞を沈殿させる。細胞のペレットを 1ml の TCA に再懸濁させ、シンチレーションバイアルに移す。

2-2-5 放射性強度の測定

^3H -TdRを用いた場合、細胞懸濁液 1ml を 10 倍希釈して β -シンチレーションカウンターにより、1分当たりの崩壊数 (Disintegrations per minute、DPM) を測定する。

^3H -methyl thymidineの取り込みはDPM/投与群（群ごとにデータを取る場合）またはDPM/個体（個体ごとにデータを取る場合）で表される。 ^{125}IU を用いた場合は、細胞 1ml をそのまま用いて γ -カウンターにより同様に測定する。

2-2-6 動物の観察

実験に使用したマウスは、実験期間中注意深く観察し、投与部位の局所刺激性のみならず、毒性兆候の発現にも注意する。実験前後の体重変化も毒性発現の判断材料とする。観察結果は動物個体ごとに記録する。

2-2-7 試験結果の算出

群ごとの試験結果として SI 値を算出する。SI 値は、試験群の DPM の Vehicle 群の DPM に対する比とする (Vehicle 群の DMP を 1 とする)。個体ごとにデータを取った場合は、群ごとに平均および標準偏差を計算した後、平均値の比を SI 値とする。個体ごとにデータを取った場合は、適切な統計手法を用いて有意差の検定を行うことができる。外れ値を示す個体があり得る事に注意すべきであり、その場合、平均値をの代わりにメジアンを用いるまたは外れ値を示した個体を除くなどの対処を行う。

2-2-8 試験結果の評価

試験した用量の何れかで SI 値が 3 以上となった場合、その被験物質を皮膚感作性物質と判断する。ただし、SI 値を唯一の判断材料とするべきではなく、有意差検定の結果、用量依存性の有無、被験物質の毒性、被験物質の安定性、溶媒対照および陽性対照が妥当な値であるかどうか、を充分に考慮して判定する。疑わしい結果である時は、構造活性および既知の毒性情報、用量設定の妥当性を考慮すべきである。

2-3 LLNA の感度、特異性、予測性、精度

ICCVAM による評価結果を引用する (表 2-1) (6)。

ICCVAM は、ヒトにおける感作性ハザードを判断する上で、guinea pig を用いる方法と同等の検出力を有すると結論付けている。

2-4 LLNA の再現性

I. Kimber らおよび S. E. Loveless らによる施設内および施設間のバリデーション結果が報告されている(16)(17)。G. F. Gerberick、I. Kimber、D. A. Basketter による提案を受け ICCVAM では、DNCB、HCA、Isoeugenol、Eugenol に関して、施設内および施設間の再現性は、充分に受け入れられるレベルであるとしている(4)(7)。

2-5 LLNA の適用範囲

推奨されている Vehicle を用いた溶液または懸濁液として、マウス耳介に投与可能なあらゆる物質が評価可能である。guinea pig を用いる方法は感作誘発期の皮膚反応を評価するため、着色したサンプルのなかには評価が困難なものもあるが、LLNA には適用可能である。

GPMT と比較すると検出感度がやや低いと言われており、弱い感作性物質および一部の金属が False negative となることが知られている。また、幾つかの強い刺激性物質は False positive となることが知られている。

参考文献

1. Kimber, I., J. A. Mitchell, A. C. Griffin. *Fd Chem. Toxicol.* (1986) **24**, 585-586.
2. Kimber, I., J. Hilton, C. Weisenberger. *Contact Dermatitis* (1989) **21**, 215-220.
3. Chamberlain, M. and D. A. Basketter. *Fd Chem. Toxicol.* (1996) **34**, 999-1002.
4. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), National Institutes of Environmental Health Sciences. *The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals /Compounds* (1999) NIH Publication No. 99-4494
5. Sailstad, D. M., D. Hattan, R. N. Hill, W. S. Stokes. *Reg. Toxicol. Phaemacol.* (2001) **34**, 249-257.
6. Dean, J. H., L. E. Twerdok, R. R. Tice, D. M. Sailstad, D. G. Hattan, W. S. Stokes. *Reg. Toxicol. Phaemacol.* (2001) **34**, 258-273.
7. Haneke, K. E., R. R. Tice, B. L. Carson, B. H. Margolin, W. S. Stokes. *Reg. Toxicol. Phaemacol.* (2001) **34**, 274-286.
8. Food and Drug Administration (FDA). *Guidance for Industry: Immunotoxicology Evaluation of Investigational New Drugs* (2002).
9. U. S. Environmental Protection Agency (EPA). *Health Effects Test Guidelines* (2003), OPPTS 870.2600, Skin Sensitization.
10. OECD *OECD Guideline for the testing of Chemicals* (2002) Guideline 429, Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay.
11. Takeyoshi, M., M. Sawaki, K. Yamasaki, I. Kimber. *Toxicology* (2003) **191**, 259-263.
12. Hatao, M., T. Hariya, Y. Katsumura, S. Kato. *Toxicology* (1995) **98**, 15-22.
13. Suda, A., M. Yamashita, M. Tabei, K. Taguchi, H. W. Vohr, N. Tsutsui, R. Suzuki, K. Kikuchi, K. Sakaguchi, K. Mochizuki, K. Nakamura. *J. Toxicol. Sci.* (2002) **27**, 205-218.
14. Basketter, D. A., L. Blaikie, R. J. Dearman, I. Kimber, C. A. Ryan, G. F. Gerberick, P. Harvey, P. Evans, I. R. White, R. J. G. Rycroft. *Contact Dermatitis* (2000) **42**, 344-348.
15. ICCVAM Immunotoxicology Working Group, ICCVAM Peer Review Panel Evaluating the LLNA. *ICCVAM IWG LLNA Protocol* (2001) Protocol: Murine Local Lymph Node Assay (LLNA).

16. Kimber, I., J. Hilton, R. J. Dearman, G. F. Gerberick, C. A. Ryan, D. A. Basketter, E. W. Scholes, G. S. Ladies, S. E. Loveless, R. V. House, A. Guy. *Toxicology* (1995) **103**, 63-73.
17. Loveless, S. E., G. S. Ladies, G. F. Gerberick, C. A. Ryan, D. A. Basketter, E. W. Scholes, R. V. House, J. Hilton, R. J. Dearman, I. Kimber. *Toxicology* (1996) **108**, 141-152.

表2-1 Guinea pig およびヒトの感作性データとの比較におけるLLNAの検出力

J. H. Dean, et al., *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, **34**, 258–273.より引用。

(TABLE 2 Performance of the LLNA Compared to Guinea Pig and Human Sensitization Data—Total Database)

Comparisons	Number of Comparison	Sensitivity		Specificity		Positive Predictivity		Negative Predictivity		Accuracy	
		%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.
LLNA vs GPMT/BA	97	91	(62/68)	83	(24/29)	93	(62/67)	80	(24/30)	89	(86/97)
LLNA vs GPT	126	87	(81/93)	82	(27/33)	93	(81/87)	69	(27/39)	86	(108/126)
LLNA vs HUMAN	74	72	(49/68)	67	(4/6)	96	(49/51)	17	(4/23)	72	(53/74)
GPMT/BA vs HUMAN	57	70	(38/54)	100	(3/3)	100	(38/38)	16	(3/19)	72	(41/57)
GPT vs HUMAN	62	71	(42/59)	100	(3/3)	100	(42/42)	15	(3/20)	73	(45/62)

LLNA; local lymph node assay, GPMT; guinea pig maximization test, BA; Buehler assay, GPT includes nonstandard guinea pig tests, HUMAN; human maximization test (HMT) plus human patch test allergen (HPTA).

資料3) LLNA-DAの原理 一代替法の原理に関する資料

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）が表皮の蛋白と結合して感作原となることにより起こることと考えられている。感作誘導期では、蛋白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、ランゲルハンス細胞は活性化して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リンパ球は活性化し、その抗原を認識する特異的なTリンパ球の増殖がおこる。

LLNAでは、マウス耳介から吸収されたハプテンによる抗原特異的Tリンパ球の耳下リンパ節における増殖を、放射性元素（RI）で標識した核酸成分（以下、³H-TdR）の取り込みを指標として検出する。

今回我々が提案するLLNAの代替法、LLNA-DAのコンセプトは、リンパ球増殖を検出する指標（エンドポイント）を変更する事であり、増殖後の細胞数を指標として検出しようとするものである。従って、ハプテンがマウス耳介より経皮的に吸収されることにより所属リンパ節のTリンパ球増殖に至る過程はLLNAと原理的に同じである。LLNAにおける³H-TdRの取り込み量は、DNAの複製量およびその後に増殖する細胞数と直接的に相関すると考えられる。従って、LLNAで陽性となる感作性物質は、所属リンパ節の細胞数を測定する事によっても検出は可能であると予想される。

LLNAでは、溶媒対照群との比較によりSI値が3を超えるものを感作性物質としている。検出の指標を変更すると、SI値が一致するとは限らない。SI値が一致しない場合は、3という閾値を変更しなければLLNAと同等の検出感度は得られないと予測される。特にSI値が低下する場合は、LLNAでようやく検出されている感作性物質は検出できない可能性がある。実際に、非RIのエンドポイントをもつ改変法では、原法に対してSI値が低くなっているものが多く見受けられる。LLNAはGPMTと比較して検出感度がやや劣るとされおり、指標変更によるSI値の低下はFalse negativeの増加を招くと考えられる。

そこで、LLNA-DAではSI値を高め、特にSI=3を示す感作性物質濃度が原法と一致するように投与操作および日程に幾つかの変更を加えた。また簡便に細胞数を測定する指標として、ルシフェリン-ルシフェラーゼ法（L-L法）によるATPの測定を採用した。その結果、ATP発光量を指標としたSI値は、SI=3付近で原法とよく一致し、従ってEC₅₀もほぼ同等の値が得られることが分かった。このことにより、LLNA-DAはLLNAと同等の検出感度を有するものと期待できる。

LLNA-DA法の変更点は以下の点である。

- 1) Day1～Day3の連続投与の後、Day7（またはDay6）に4回目の投与を追加する。
- 2) 各投与の1時間前に、1%SDSによる前処理を行う。
- 3) 4回目投与の24時間後にリンパ節を摘出し、細胞懸濁液のATP含量をL-L法により測定し、その発光量をエンドポイントとする。

1)および2)はSI値を高める事が目的である。3)は簡便でありSI=3付近で原法とよく一致することから採用した。以下に変更点および検出感度一致の原理について実験結果を基に記述する。

3-1 Day 7投与の効果

Eugenolの10%AOO溶液、DNCBの0.25%AOO溶液を用いて、4回目の投与による効果を確認した(図3-1)。検体および被験物質を3日間連続で耳介に投与した後、Day7、Day8におけるリンパ節重量と、Day7に4回目の投与を行いその24時間後(Day8)におけるリンパ節重量を比較した。示した値は並行して行ったAOO投与群に対するSI値である。Day7、Day8では共に3日連続投与によるリンパ節重量の増加が認められるが、両者の間に明確な差はない。これに対し、Day7に4回目の投与を行うとDay8におけるSI値は飛躍的に向上する。

Day6に4回目の投与を行う事によっても同様の効果が得られることが確認されている。

3-2 SDS前処理による効果

Sodium lauryl sulfate (SDS)は刺激性物質であり、高濃度のSDSはLLNAで偽陽性となる事が知られている(1)。さらにSDSは1%の用量では有意な増加は示さないが、これを前処理に用いる事で、感作性物質のSI値を向上させる効果があることが報告されている(2)(3)。

Eugenolの10%AOO溶液を用いて、SDS前処理の効果を検討したところ、リンパ節重量の平均値、そのSI値とも約1.3倍に向上することが確認された(表3-1、図3-2)。AOO投与群ではSDS前処理による変化はごく僅かな増加にとどまった。

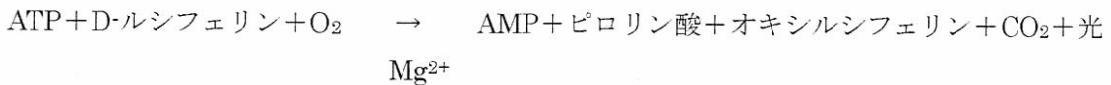
SDSはランゲルハンス細胞の遊走を亢進すると言われており、この効果によってSI値が向上している可能性がある(4)(5)。また、SDSの界面活性作用による耳介表面の浸透性向上、油成分の除去などの効果が期待できる。

3-3 エンドポイントとしてのATP発光量および検出感度の一致

3-3-1 L-L法によるATP測定原理と細胞数測定への利用

ルシフェリン・ルシフェラーゼ法(L-L法)はホタルの生物発光原理を応用したATP量の測定方法である。ホタルルシフェラーゼは以下の反応により光を生じる。

ルシフェラーゼ



酵素反応により生じる光の量は ATP 量に比例するため、発光量を測定する事により ATP を定量できる。L-L 法における ATP 量と発光量との相関については、直線性が確認されている(6)。

細胞懸濁液を界面活性剤で処理し、遊離した ATP を L-L 法により測定する事により細胞数を求める手法は、主に微生物の生菌数測定や清潔度管理の目的に利用されている。均一な細胞懸濁液では ATP 量と細胞数とに良好な直線性があり、ダイナミックレンジが広い。測定は非常に簡便で、1 サンプルあたり約 5 分で測定できる。試薬キットも数社から販売されている。

リンパ球数の指標として利用している報告もある(7)。

3-3-2 エンドポイントの比較

Isoeugenol/AOO (2.5%~50%)、10%Eugenol/AOO (陽性対照)、AOO (Vehicle) について LLNA-DA を実施し、更にその中で調製した組織懸濁液を計数板で測定して個体ごとのリンパ球数 (cell number/animal) を求めた。リンパ節重量、ATP 発光量、細胞数について投与群ごとに SI 値を求め、3 つのエンドポイントを比較した (図 3-3)。

すべての投与群および陽性対照群で、SI 値は、リンパ節重量 < ATP 発光量 < 細胞数となった。それぞれの SI 値より EC₅₀ を算出すると、リンパ節重量で 8.02%、ATP 発光量で 2.28%、細胞数で 0.31% であった。Isoeugenol の LLNA による EC₅₀ は 1.3~3.3% と報告されている (1)(8)。従って、Isoeugenol の場合 LLNA と EC₅₀ が最もよく一致するエンドポイントは ATP 発光量である (図 3-4)。リンパ節重量では SI 値が低すぎるために、細胞数は SI 値が高すぎるために LLNA と EC₅₀ が一致せず、従ってリンパ節重量では False negative が増加し、細胞数では False positive が増加すると予想される。

リンパ節重量は感度が充分とは言えないが、細胞増殖の指標としては最も簡便に測定できる。細胞数は SI 値が高すぎる事に加え、全ての動物個体について計測する事は作業負荷がかなり高く、これを毎回の試験で実施することは実用性に乏しい。これに対し ATP 発光量は感度が LLNA に近いのみならず、測定が簡便かつ迅速であるという大きなメリットがある。試薬・測定装置が比較的安価であることから実用性も高い。

これらの事から、LLNA-DA では ATP 発光量をエンドポイントとする事とした。リンパ節重量は簡便に測定できるので、同時に実施し、試験判定の判断材料とする。

3-3-3 ATP 発光量、リンパ節重量の細胞数との相関

細胞数に対する ATP 発光量、リンパ節重量をそれぞれ個体ごとにプロットした (図 3-5)。図では同時に検討した MBT (2-Mercaptobenzothiazol) のデータも合わせて表示した。なお、MBT のデータは BALB/c マウスを用いて行った結果である。ATP 発光量、リンパ節重量ともに細胞数と直線の相関があることが確認された。

この結果は、細胞数の増加に寄与している細胞においては、個々に含まれる ATP 量がほぼ一定であり、それは増殖の程度によらない事を示唆している。これらの大部分はリンパ球であると考えられ、ATP 含量においてほぼ均一な細胞集団になっていることが示された。

これらの事から、ATP 発光量およびリンパ節重量を LLNA-DA における細胞数の指標として用いることに問題はないといえる。

3-3-4 エンドポイントにより SI 値が異なる理由

リンパ節重量はリンパ球の増殖を間接的に表現するが、摘出されたリンパ節の重量にはリンパ球以外の組織やリンパ液等も含まれている。また、ATP の測定値にもリンパ球以外の組織に由来する ATP よる発光も一部含まれると考えられる。(LLNA-DA のプロトコール、細胞懸濁液調製法参照)。これに対し、細胞数のデータにはリンパ球以外の要素は含まれない(リンパ球以外の細胞で、形態が類似しているためカウントされてしまう細胞はあり得るが、その比率は極めて低いと予想されるためここでは考えないものとする)。図 3-5 のグラフが直線であるということは、感作性物質によって主に増加するのはリンパ球であって、他の組織やリンパ液等ではない事を示唆している。図 3-6 (LLNA-DA 法) に Vehicle 投与群と感作性物質投与群のリンパ節の状態を模式的に示した。主に増加するのがリンパ球であるならば、リンパ球以外の要素が含まれるほど SI 値は低くなる。これが、リンパ節重量 < ATP 発光量 < 細胞数となった理由であると考えられる。

3-3-5 EC₃一致の原理

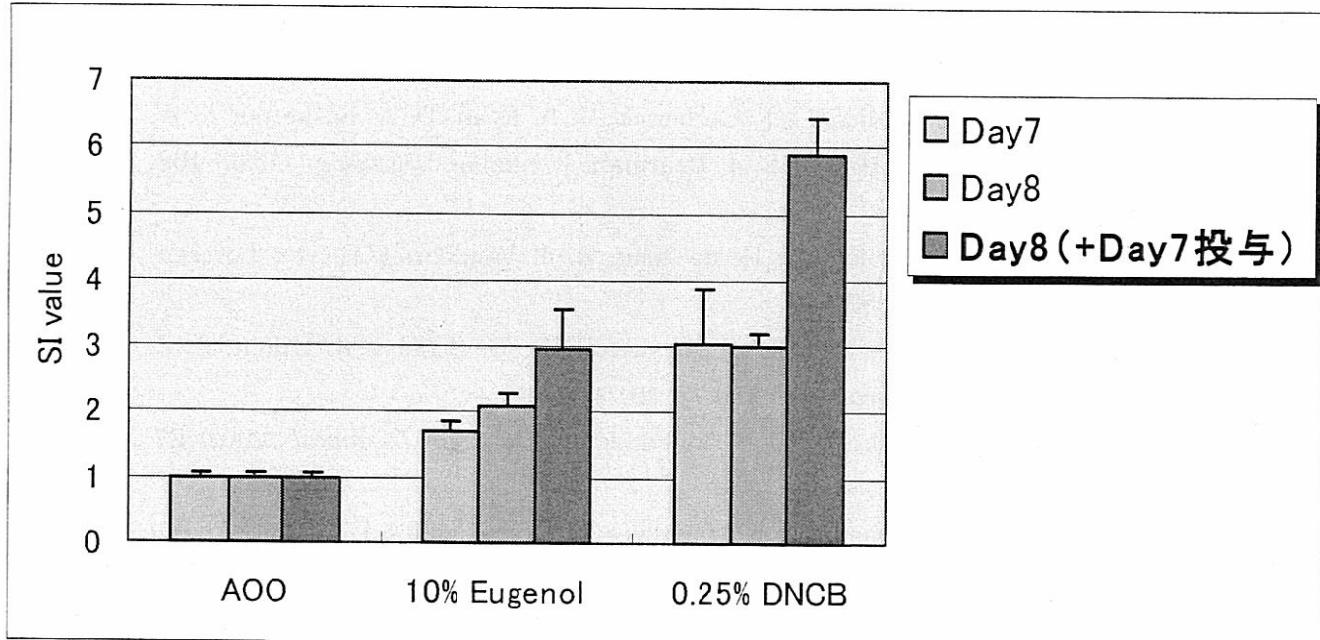
図 3-6 は、用いた感作性物質の用量が LLNA で $SI=3$ になる濃度 (即ち LLNA での EC₃) である場合の概念図である。LLNA は、³H-TdR の取り込みがエンドポイントであるため、上記と同様の理由から細胞数よりも更に高い SI 値を与えるはずである。しかしながら、LLNA-DA では 4 回目の投与および SDS の前処理を行っているため、同じ用量であってもリンパ球数は LLNA を上回っていると考えられる。これによって SI 値が向上し、細胞数では LLNA を上回り、ATP では LLNA と同等の値を得ることが出来ると考えられる。

この関係が成り立つのは、感作性物質の用量が EC₃ の場合であって、リンパ球の増加には物理的および生物学的な限界があるため、例えばより高用量では LLNA の方がより高い SI 値を示すと予想される。

しかしながら、LLNA で $SI=3$ となる用量において、LLNA-DA でのリンパ節の状態が感作性物質によらず同じであると仮定するならば、ATP を指標とした LLNA-DA の EC₃ はあらゆる被験物質で LLNA と一致すると考えられる。また、LLNA の判定の閾値は $SI=3$ であるから、LLNA-DA の検出感度が LLNA とほぼ同等となることが期待できる。

参考文献

1. Loveless, S. E., G. S. Ladics, G. F. Gerberick, C. A. Ryan, D. A. Basketter, E. W. Scholes, R. V. House, J. Hilton, R. J. Dearman, I. Kimber. *Toxicology* (1996) **108**, 141-152.
2. van Och, F. M. M., W. Slob, W. H. de Jong, R. J. Vandebriel, H. van Loveren. *Toxicology* (2000) **146**, 49-59.
3. Cumberbatch, M., R. C. Scott, D. A. Basketter, E. W. Scholes, J. Hilton, R. J. Dearman, I. Kimber. *Toxicology* (1993) **77**, 181-191.
4. Smith, H. R., D. A. Basketter, J. P. McFadden. *Clin. Exp. Dermatol.* (2002) **27**, 138-146.
5. Cumberbatch, M., R. J. Dearman, R. W. Groves, C. Antonopoulos, I. Kimber. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2002) **182**, 126-135.
6. Sakakibara, T., S. Murakami, N. Hattori, M. Nakajima, K. Imai. *Analytical Biochemistry* (1997) **250**, 157-161.
7. Ishizaka, A., T. Tonoroka, S. Matsumoto. *J. Immunol. Methods* (1984) **72**, 127-132.
8. Basketter, D. A., L. Blaikie, R. J. Dearman, I. Kimber, C. A. Ryan, G. F. Gerberick, P. Harvey, P. Evans, I. R. White, R. J. G. Rycroft. *Contact Dermatitis* (2000) **42**, 344-348.



Data presented as mean \pm S. D.
AOO ; Acetone/Olive oil (4:1, v/v)
DNCB ; 2,4-Dinitrochlorobenzene

図3-1 4回目投与によるSI値の向上 リンパ節重量のSI値を、並行して行ったAOO群の値を1として比較した。Day1からDay3まで3日間連続投与を行った後、□;Day7のリンパ節重量のSI値、■;Day8のリンパ節重量のSI値、■;Day7に4回目の投与を行い、その24時間後(Day8)におけるリンパ節重量のSI値。

表 3-1 SDS前処理の効果 リンパ節重量の群平均を比較した。

Test material	SDS pretreatment	Lymph Node Weight(mg)
AOO	+	3.77 ± 0.60
10% Eugenol/AOO	+	9.49 ± 2.48
AOO	-	3.65 ± 0.19
10% Eugenol/AOO	-	7.13 ± 1.10

Data presented as mean ± S. D.
AOO; Acetone/Olive oil (4:1, v/v)

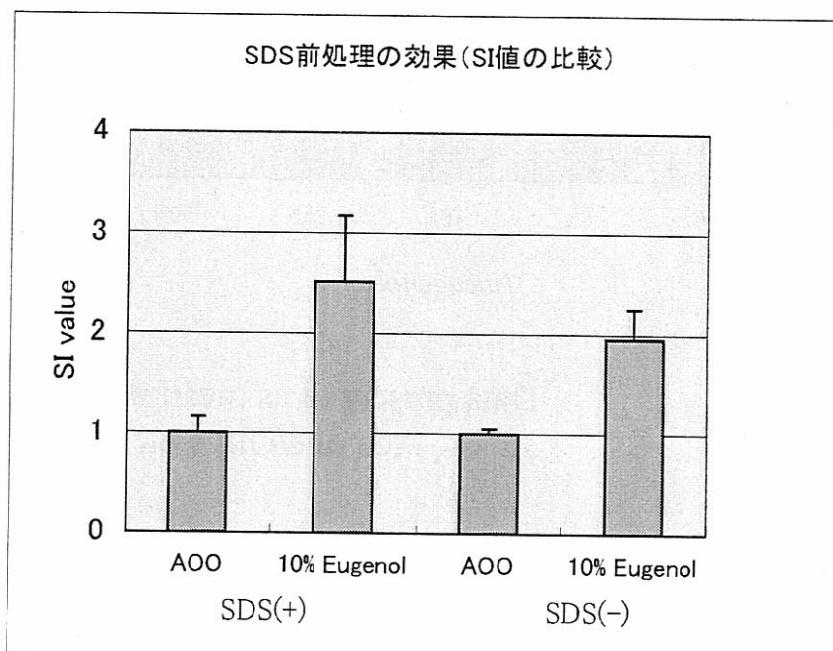
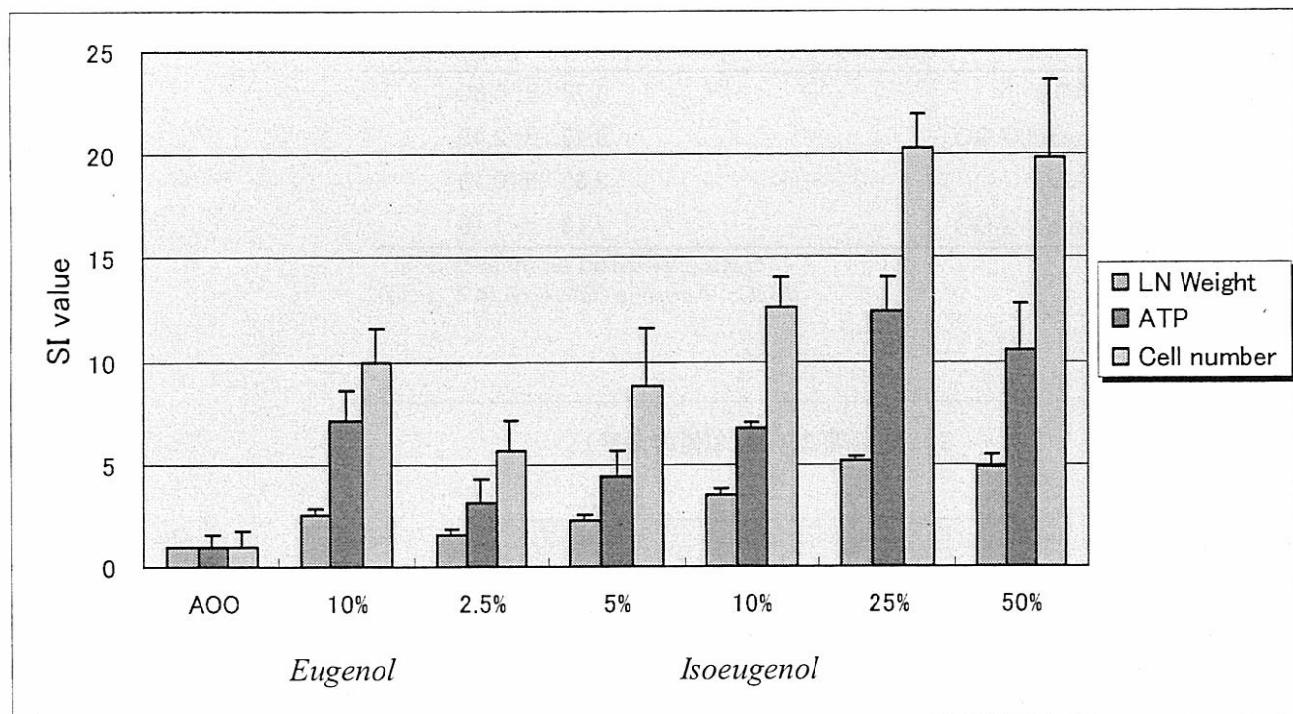


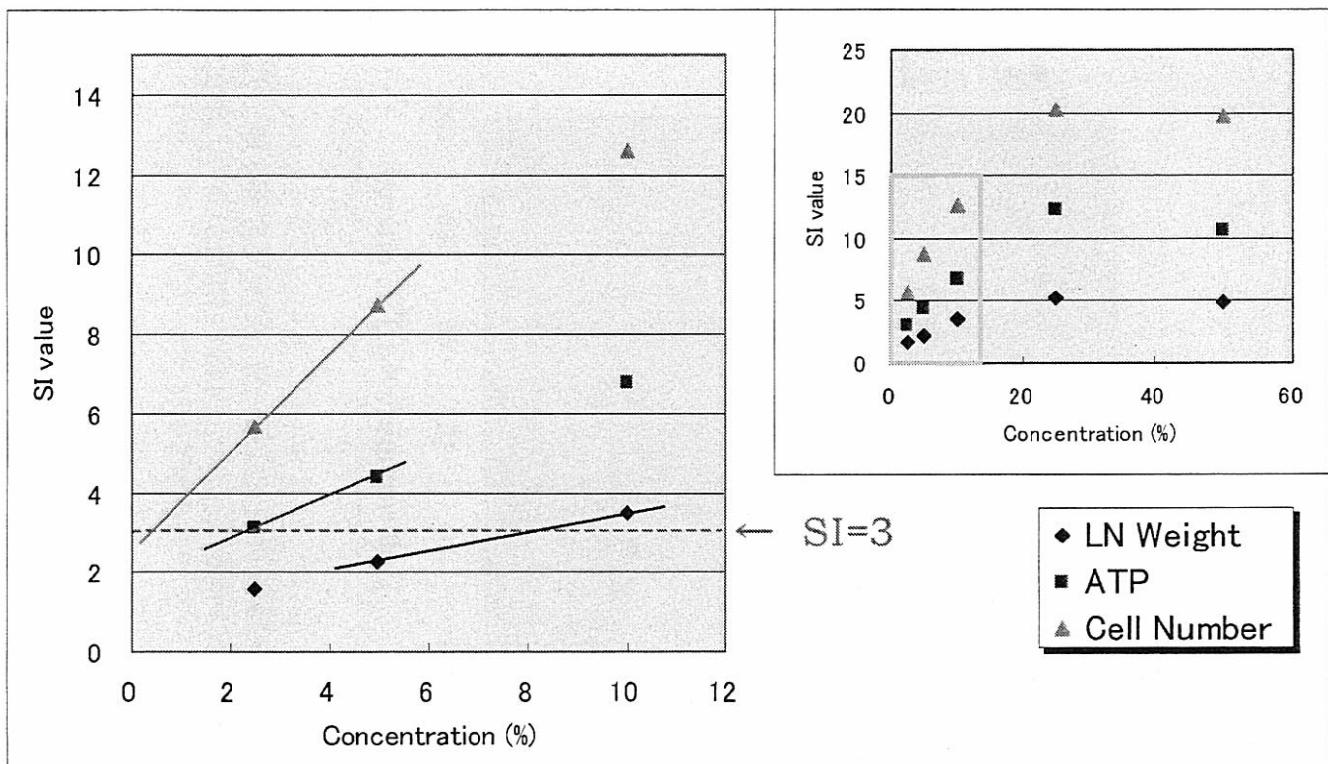
図3-2 SDS前処理の追加によるSI値の増加 リンパ節重量のSI値を、並行して行ったAOO群の値を1として比較した。



Data presented as mean \pm S. D.
AOO ; Acetone/Olive oil (4:1, v/v)

図3-3 検出方法によるSI値の差異 3種類のエンドポイントによるSI値を比較した。値はリンパ節重量、ATP発光量、細胞数を個体ごとに測定し、AOO群を1とした各投与群のSI値を示している。

すべての試験群でSI値はリンパ節重量<ATP発光量<細胞数となった。



$EC_3 = 8.02\% \text{ (LN Weight)}$

$EC_3 = 2.28\% \text{ (ATP)}$

$EC_3 = 0.31\% \text{ (Cell Number)}$

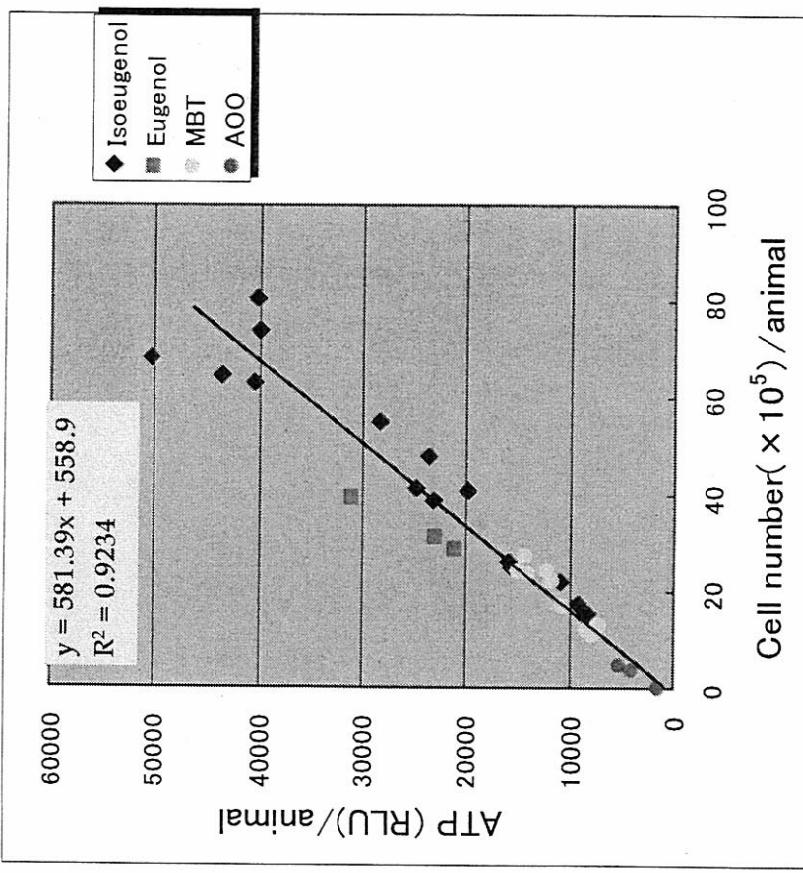
$EC_3 = 1.3 \sim 3.3\%$
(LLNA文献値¹⁾⁸⁾)

図3-4 IsoeugenolにおけるEC₃の比較 Isoeugenolについて3種類のエンドポイントによるSI値を用量に対してプロットした。図に示した2点よりEC₃をそれぞれ求めた。ATP発光量をエンドポイントとしたとき、LLNAの文献値と最も一致する。

1) Loveless, S. E., et al., *Toxicol.* (1996) **108**, 141-152.

8) Basketter, D. A., et al., *Contact Dermatitis* (2000) **42**, 344-348.

A)



B)

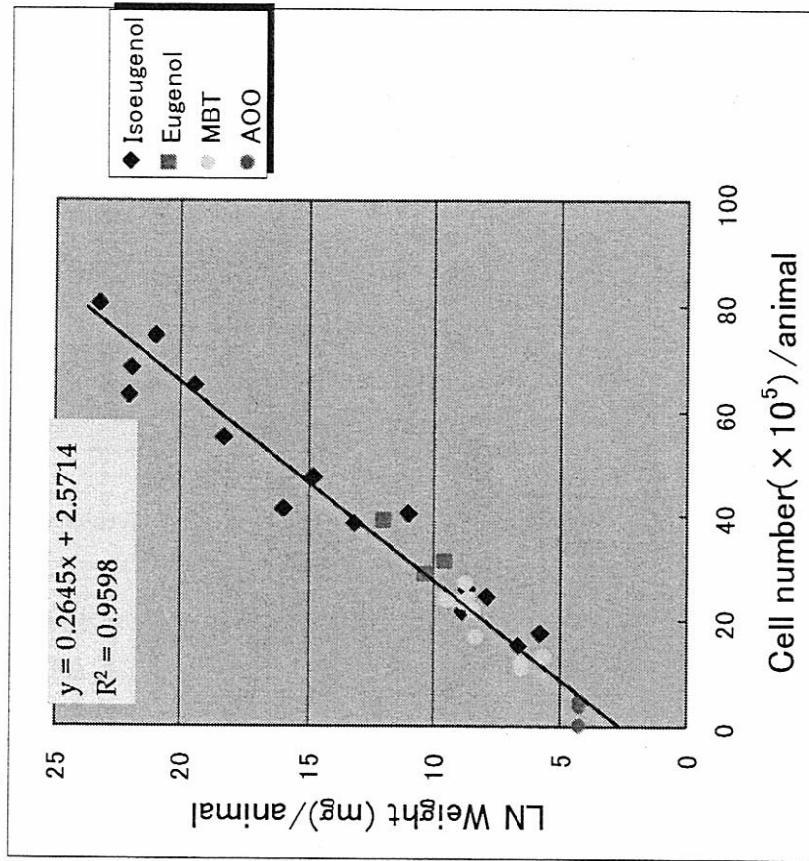


図3-5 リンパ節重量・ATP発光量・細胞数との相関 異なる検体・用量の被験物質による A) ATP発光量、B) リンパ節重量の値を細胞数に対して個体ごとにプロットした。ATP発光量、リンパ節重量は細胞数に正の相関がある。細胞数の増加に関与している細胞あたりのATP量・重量は、感作の強度によらずほぼ一定である事を示している。

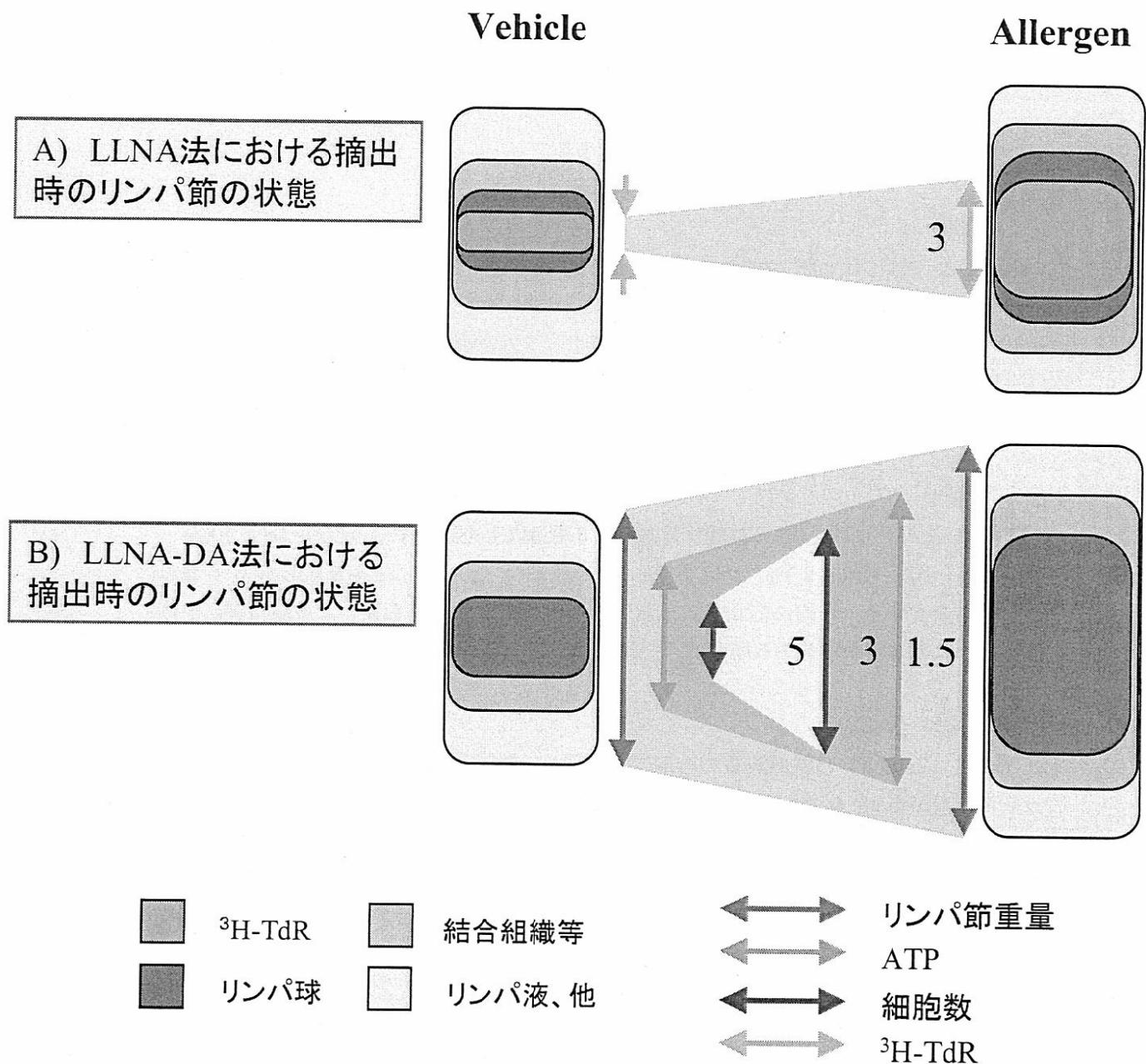


図3-6 LLNA、LLNA-DAにおけるリンパ節の概念図:SI値の比較およびEC₃一致の原理

A) LLNAにおけるVehicle投与群と感作性物質投与群(Allergen)の摘出時(Day6)のリンパ節の状態を示した。感作性物質の用量はEC₃の濃度であるとする。このとき $^3\text{H-TdR}$ 取り込み量のSI値は3である。

B) LLNA-DAにおける摘出時(Day8)のリンパ節の状態を示した。A)と同じVehicle、Allergenを使用したとする(Allergenの用量はLLNAのEC₃)。

試験の条件が同じであれば、SI値は $^3\text{H-TdR} >$ 細胞数 $>$ ATP $>$ リンパ節重量となるはずである。LLNA-DAでは試験法の違いからリンパ球数がLLNAを上回っていると考えられ、このためSI値が向上し、ATP発光量でLLNAとほぼ同等の値となる。LLNAでSI=3となる用量におけるLLNA-DAでのリンパ節の状態が感作性物質によらず同じであると仮定すれば、ATPを指標としたLLNA-DAのEC₃はあらゆる被験物質でLLNAと一致すると考えられる。

資料4) LLNA-DAのプロトコール —試験法の詳細なプロトコール

LLNA-DA 試験のプロトコールを以下に記述する。

4-1 使用動物

LLNA-DA には CBA/JN マウスの出産および妊娠経歴のない雌で、試験開始時に 8~12 過齢のものを使用する。入荷時に体重測定を実施し、異常が認められる動物は使用しない。室温 22°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$)、湿度 30~70%、12 時間明暗サイクルの条件下で飼育を行い、餌および水は自由に摂取させる。5 日以上の馴化の後、皮膚に異常が認められない動物を試験に供する。

4-2 用量設定

1群3匹以上のマウスを用い、被験物質あたり 3 用量以上を設定する。投与用量は、100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.5% の系列から、少なくとも連続した 3 用量以上を含むものとする。目的に応じて、上記以外の用量を追加しても良い。被験物質に急性毒性あるいは皮膚刺激性がある場合は、それを考慮して最高用量を設定する。

4-3 使用溶媒 (Vehicle)

使用溶媒 (Vehicle) は被験物質の溶解性を考慮し、溶液または懸濁液として最も高濃度で投与可能な Vehicle を選択する。Vehicle の優先順位は、Acetone/olive oil (4:1 v/v, AOO)、Dimethylformamide (DMF)、Methyl ethyl ketone (MEK)、Propylene glycol (PG)、Dimethyl sulfoxide (DMSO) である。その他の Vehicle も充分な科学的根拠があれば使用可能である。マウス耳介に広がりにくくかつ乾きにくい Vehicle ほど、投与量が不正確になる恐れがあるため、避けるのが望ましい。

4-4 陰性対照および陽性対照

陰性対照群として、試験に使用した Vehicle の投与群を設ける。

試験の信頼性を確保するため、陽性対照群を設ける。陽性対照物質は、LLNA-DAにおいて陽性反応が得られていることが確認されている物質を用い、ATP を指標とした SI 値が 3 を超えると予想される濃度で使用する。陽性対照は、試験に使用した Vehicle を用いて設定することが望ましいが、当該 Vehicle において陽性反応が得られることが確認された物質がない場合は、他の Vehicle を用いた陽性対照群を設定することとする。

例として Eugenol (CAS No: 97-53-0) の 10% AOO 溶液、Hexyl cinnamic aldehyde (HCA, CAS No: 101-86-0) の 15% AOO 溶液が陽性対照として使用できる。

陰性対照群および陽性対照群は試験群と同じ操作を並行して行う。

4-5 SDS 水溶液の調製

Sodium lauryl sulfate (SDS、CAS No:151-21-3) を秤量後、蒸留水 (D. W.) を添加する。蒸留水添加量は、SDS 0.1000gあたり 10.00mlとする。これを溶解させ 1%SDS 水溶液とする。

調製した 1%SDS 水溶液は、15ml 容チューブに約 3ml ずつ分注し、設定した投与群ごとに使用する。15ml 容チューブには使用する投与群を明示しておく。

4-6 試験液および陽性対照物質溶液の調製

被験物質は適切な Vehicle を用いて溶液または懸濁液とし、試験液とする。

被験物質が液体の場合、原則として v/v%で目的の濃度に調製する。被験物質が固体の場合もしくは粘性が高い液体で正確な定容が困難な場合は、w/v%で目的の濃度に調製する。

Vehicle 添加後、よく攪拌し溶解または懸濁液とする。懸濁液の場合は投与操作の直前にも充分な攪拌が必要である。投与が困難な場合は、被験物質の前処理（粉碎）および後処理（加温、超音波処理、ポリトロン処理）を行う。

調製後の高用量試験液が溶液である場合に限り、より低用量の試験液は、高用量試験液の一部を使用溶媒で希釈して調製しても良い。希釈は v/v で行う。

陽性対照物質溶液の調製も同様とする。

調製は 15ml 容チューブまたは 50ml 容チューブを用いて行う。

4-7 投与日程

- Day 1 :

エーテル麻酔下、1%SDS 水溶液をマウスの両耳介背面に筆を用いて適量を塗布する。操作は投与群ごとに連続して行う。

1%SDS 水溶液塗布の 1 時間後、各濃度に調製した被験物質溶液または懸濁液、および Vehicle、陽性対照物質溶液を、マウスの両耳介背面に滴下し開放曝露させる。滴下量は、耳介あたり $25 \mu\text{L}$ ($50 \mu\text{L}/\text{animal}$) とする。

- Day 2、Day 3 :

Day 1 同じ操作を行う。1%SDS 水溶液塗布時に、前日に投与した被験物質がマウス耳介に残留している事を考慮すべきである。SDS 水溶液へのコンタミを避けるため、一投与群終了ごとに筆の交換または充分な水洗を行う。

- Day 7 (または Day 6) :

Day 2、Day 3 同じ操作を行う。

- Day 8 (または Day 7)

マウスの体重を個別に測定する。

前日の滴下曝露の 24 時間後から 30 時間後の間に、マウスを安樂死せしめ、両耳下リンパ節の摘出およびリンパ節重量の測定、細胞懸濁液の調製、ATP 発光量の測定を行

う。

4-8 リンパ節の摘出および重量測定

マウスをエーテル麻酔により安楽死せしめ、直ちに両耳下リンパ節を摘出する。摘出するリンパ節は、LLNA のプロトコールに記載された図に従う(1)。摘出したリンパ節は個体ごとにシャーレに纏め、電子天秤で直ちに湿重量を測定する。

4-9 細胞懸濁液の調製

個体ごとのリンパ節を 2 枚のスライドグラスにはさみ押しつぶし（図 4-1）、組織が薄く広がったのを確認したのち、引き離す。

両スライドグラス上の組織を $500 \mu\text{L}$ の PBS に懸濁させる。スライドグラスを 1 枚ずつ、シャーレで受けながら PBS を掛け流しセルスクレーパーでスライドグラス上の組織を掻き取る、これを数回それぞれ繰り返す（図 4-2）。2 枚のスライドグラスに対し使用する PBS のトータル量を $500 \mu\text{L}$ とする。

最後にシャーレの組織懸濁液をセルスクレーパーで軽く攪拌する。

シャーレに調製された組織懸濁液から、肉眼で確認できる膜組織を避けて $20 \mu\text{L}$ を採取し、PBS 1.98ml に添加（100 倍希釈）、よく攪拌して細胞懸濁液とする。細胞懸濁液は個体ごとに 2 本ずつ作成する（系統 1、系統 2）。

4-10 ATP 量の測定

ATP 量の測定は LumiTech™ ViaLight™ HS BioAssay kit を用いて行う。

予め、ルミノメーター用チューブに「Nucleotide Releasing Reagent (NRR)」（ATP 抽出試薬、界面活性剤）を $90 \mu\text{L}$ ずつ分注しておく。細胞懸濁液をよく攪拌後 $90 \mu\text{L}$ を採取し、ルミノメーター用チューブに添加しよく攪拌する。5 分間静置後、「ATP Monitoring Reagent (AMR)」（発光試薬、ルシフェリン・ルシフェラーゼ・ Mg^{2+} 溶液） $20 \mu\text{L}$ を添加し、すばやく攪拌後、直ちにルミノメーターで発光量 (RLU) を測定する。ルミノメーター（キッコーマン社製、ルミテスター C-100）は 10 秒間の発光量を測定する。

AMR 添加後の発光量は、経時的かつ速やかに減少するため、AMR 添加からルミノメーターの測定ボタンを押すまでの操作は、出来るだけすばやく、かつ出来るだけ一定のリズムで行うことが大切である。

4-11 摘出から ATP 測定までの操作に関する注意事項

動物死亡後はリンパ節の ATP 含有量は経時に減少する。従って、動物の安楽死から ATP 測定までの操作は速やかに実施し、少なくとも 20 分以内に完了させる。その所要時間は個体間で出来る限り一定である事が望まれる。

操作フローの例を図 4-3-1 および図 4-3-2 に示す。

4-12 動物の観察

実験に使用したマウスは、実験期間中注意深く観察し、投与部位の局所刺激性のみならず、毒性兆候の発現にも注意する。摘出当日の体重も毒性発現の判断材料とする。

4-13 試験結果の算出

リンパ節重量は測定値を個体のデータとする。ATP 量は、2 系統の発光量 (RLU) の平均値を個体のデータとする。それぞれ投与群ごとに、個体データの平均値および標準偏差を算出する。

Vehicle 群の平均値に対する試験群の平均値の比を算出し、SI 値とする (Vehicle 群の平均値を 1 とする)。Vehicle 群と試験群の分散を *F* 検定により確認した上で、スチューデントの *t*-test により有意差検定を行う。

外れ値を示す個体があり得る事に注意すべきであり、その場合、平均値の代わりにメジアンを用いるまたは外れ値を示した個体を除くなどの対処を行う。

4-14 試験結果の評価

試験した用量の何れかで ATP 量の SI 値が 3 以上となった場合、その被験物質を皮膚感作性物質と判断する。ただし、ATP 量の SI 値を唯一の判断材料とするべきではなく、有意差検定の結果、用量依存性の有無、被験物質の毒性、溶媒対照および陽性対照が妥当な値であるかどうか、を充分に考慮して判定する。リンパ節重量の情報および SI 値だけでなく個々の測定値も判断材料とする。疑わしい結果である時は、構造活性および既知の毒性情報、被験物質の安定性、用量設定の妥当性を考慮すべきである。

4-15 機器および器具、試薬

今回使用した実験機器および実験器具のリストを表 4-1 に、使用した試薬および溶媒のリストを表 4-2 に示す。ルミノメーター用チューブ、15ml 容チューブ、50ml 容チューブ、シャーレ、スライドグラスは、使い捨てとする。

参考文献

1. ICCVAM Immunotoxicology Working Group, ICCVAM Peer Review Panel Evaluating the LLNA. *ICCVAM IWG LLNA Protocol* (2001) Protocol: Murine Local Lymph Node Assay (LLNA).

表4-1 実験機器、実験器具リスト

機器・器具名	メーカー	商品名または品番	規格、その他
ルミノメーター	キッコーマン株式会社	LUMITESTER C-100	測定範囲 : 4×10^{-12} ~ 1×10^{-6} M ATP 上限 : 1000000RLU
ルミノメーター用チューブ	キッコーマン株式会社	ルミチューブ	3.5ml、55 × 12mm φ、ポリプロピレン製、EOG滅菌済み
15ml容チューブ	IWAKI	遠沈管	ポリプロピレン製、Non-pyrogenic、Sterile
50ml容チューブ	IWAKI	遠沈管	ポリプロピレン製、Non-pyrogenic、Sterile
シャーレ	Corning Inc.	Cell Culture Dish	35mm × 10mm、Non-pyrogenic、Sterile
セルスクレーバー	Costar Corporation	Disposable cell scraper	Sterile
スライドグラス	MATSUNAMI GLASS IND., LTD.	MICRO SLIDE GLASS	76 × 26mm、Thickness 0.9~1.2mm
ボルテックスキサー	Scientific industries, Inc.	VORTEX-GENIE 2™	
電子天秤(試薬調製用)	METTLER	AJ 180	最小 0.0001g (0.1mg)
電子天秤(リンパ節重量測定用)	METTLER	AE 240	最小 0.00001g (0.01mg)
筆	一休園	和尚	細筆B、漢字用一般細字用

表4-2 試薬、溶剤リスト

試薬・溶剤名		規格または品番	CASRN	Source	Lot No.
SDS	Sodium lauryl sulfate		151-21-3	Nacalai	M9N2571
Acetone	Acetone	試薬特級	67-64-1	Kanto	409A3105
Olive oil	Olive oil	日本薬局方 オリブ油	-	吉田製薬	001571
DMSO	Dimethylsulfoxide, dehydrated	有機合成用	67-68-5	Wako	DWJ9513
DMF	Dimethylformamide	試薬特級	68-12-2	Wako	V2P1219
PBS	Phosphate Buffered Saline, 7.2	Gibco™ 0.1 μm filtered	-	Invitrogen	1157913, 3069857
発光試薬	LumiTech™ Vialight™ HS BioAssay kit	LT07-211	-	BioWhittaker	TK0043, TK0027
蒸留水	Destilled Water	日本薬局方 注射用水	-	大塚製薬工場	K3A85, K0J73

Nacalai: Nacalai Tesque, Inc. Kyoto, Japan. ナカラライテスク株式会社
 Kanto: KANTO CHEMICAL CO., INC. Tokyo, Japan. 関東化学会社

吉田製薬: 吉田製薬株式会社

Wako: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 和光純薬工業株式会社

Invitrogen: Invitrogen Corporation

BioWhittaker: BioWhittaker Molecular Applications

大塚製薬工場: Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc. 株式会社大塚製薬工場

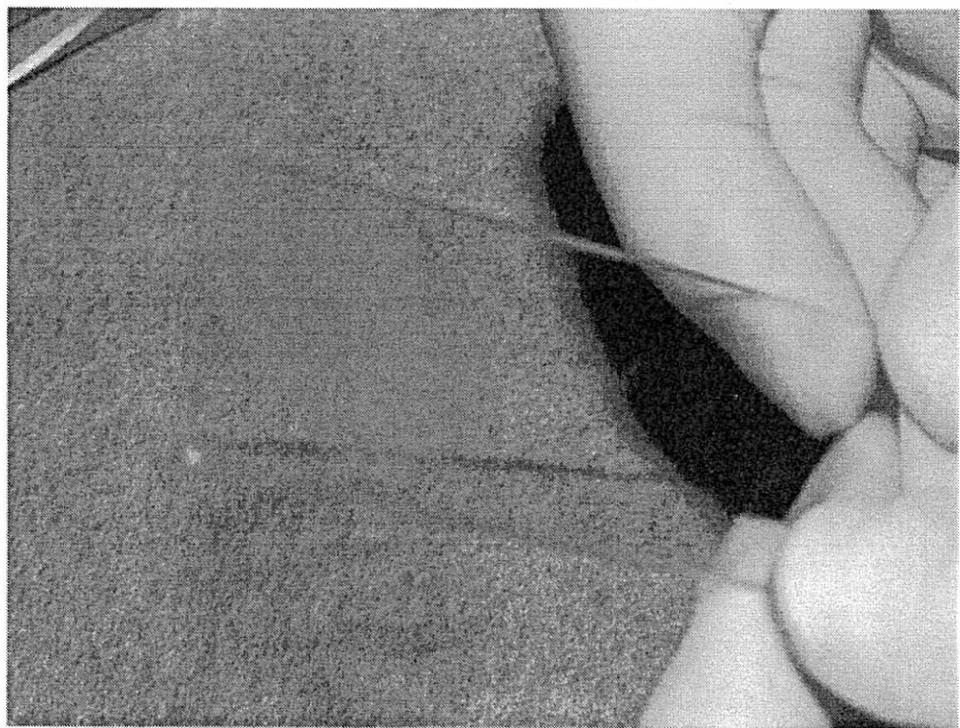


図4-1 細胞懸濁液の調製(1) 摘出したリンパ節を個体ごとに二枚のスライドグラスにはさみ押しつぶす。

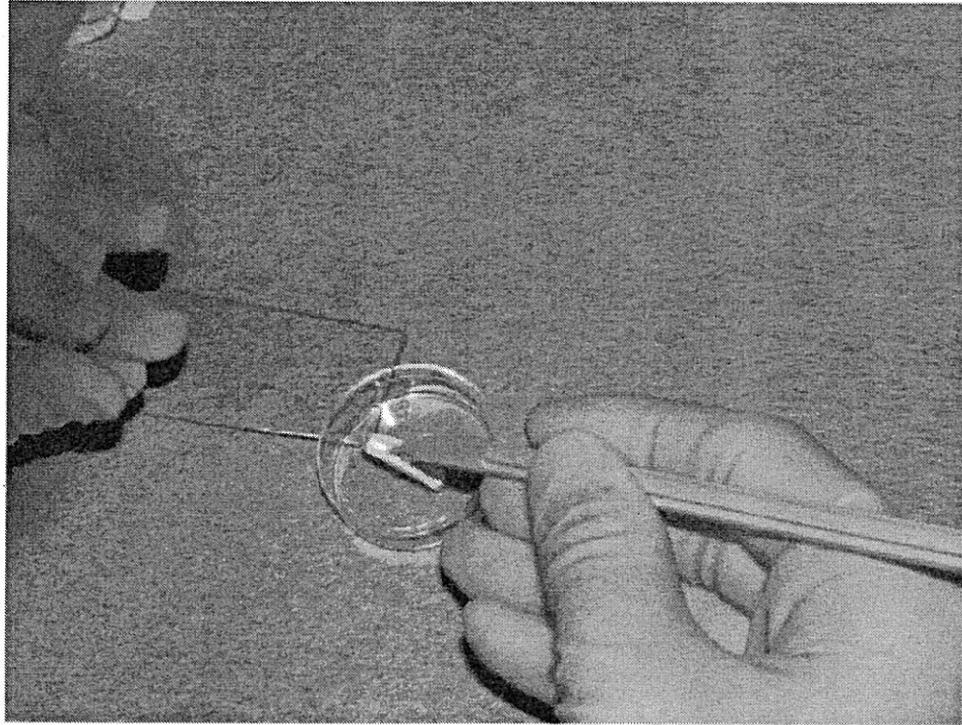


図4-2 細胞懸濁液の調製(2) PBSを掛け流し、セルスクレーパーでスライドグラス上の組織を掻き取る。シャーレの液をすくいながら数回繰り返す。PBS量は個体ごとに $500 \mu\text{L}$ とする。

《一人の作業者で実施する場合》

エーテル麻酔にて安楽死

1個体のみ。

両耳下リンパ節摘出

摘出したリンパ節はシャーレに纏める。

リンパ節重量測定

電子天秤で重量測定

細胞懸濁液調製

リンパ節を二枚のスライドグラスで押しつぶし、 $500\mu\text{L}$ のPBSに懸濁させる。

肉眼で確認できる膜組織を避け、 $20\mu\text{L}$ 採取し、PBS 1.98mL に懸濁させ、よく攪拌する。

PBS 1.98ml は予め個体あたり2本ずつ作成しておき、2系統の細胞懸濁液を調製する。

ATP測定

予めNRRを $90\mu\text{L}$ ずつルミノメータ - 用チューブに分注しておく

系統1の細胞懸濁液をよく攪拌し、 $90\mu\text{L}$ を採取、NRR $90\mu\text{L}$ 中に添加、よく攪拌して静置する。

系統2の細胞懸濁液をよく攪拌し、 $90\mu\text{L}$ を採取、NRR $90\mu\text{L}$ 中に添加、よく攪拌して静置する。

系統1添加の5分後、AMR $20\mu\text{L}$ を添加し、素早く攪拌後、ルミノメーターで10秒間のATP発光量を測定する。

系統2添加の5分後、AMR $20\mu\text{L}$ を添加し、素早く攪拌後、ルミノメーターで10秒間のATP発光量を測定する。

ATP測定タイムコース

0min 系統1、NRRに添加

0.5min 系統2、NRRに添加

5min 系統1、AMR添加、測定

5.5min 系統2、AMR添加、測定

図4-3-1 操作フローの例1 一人の作業者で行う場合は、個体ごとに安楽死からATP測定までの操作を連続して行う。

《複数の作業者で実施する場合》

a) エーテル麻酔にて安楽死（作業者1）

1投与群（3匹～4匹）、1群5匹以上場合は、2回に分ける。

b) 両耳下リンパ節摘出（作業者2）

摘出したリンパ節は個体ごとにシャーレに纏める。

c) リンパ節重量測定（作業者1）

電子天秤で個体ごとに重量測定。

d) 細胞懸濁液調製（作業者3）

個体ごとに細胞懸濁液を調製。2系統/動物。

e) ATP測定（作業者4）

予めNRRを $90\mu\text{L}$ ずつルミノメーター用チューブに分注しておく。

細胞懸濁液が揃うタイミングを見計らって測定を開始する。

ATP測定タイムコース

0min	動物1系統1、NRRに添加
0.5min	動物1系統2、NRRに添加
1min	動物2系統1、NRRに添加
1.5min	動物2系統2、NRRに添加
2min	動物3系統1、NRRに添加
2.5min	動物3系統2、NRRに添加
...	
5min	動物1系統1、AMR添加、測定
5.5min	動物1系統2、AMR添加、測定
6min	動物2系統1、AMR添加、測定
6.5min	動物2系統2、AMR添加、測定
7min	動物3系統1、AMR添加、測定
7.5min	動物3系統2、AMR添加、測定
...	

図4-3-2 操作フローの例2 複数の作業者で分担して行う場合は群ごとに安楽死させてもよい。フローは4人の作業者で実施する例。a)とb)を一人の作業者で、c)とd)を一人の作業者で行い、3人で行う事も可能。安楽死からATP測定終了までの所要時間は各個体20分以内になるようにする。

資料 5) LLNA-DA で評価した被験物質リスト

—検討した被験物質のリストと化学物質としての特性に関する資料

LLNA-DA で評価した被験物質は 17 検体であり、そのリストを表 5-1 に纏めた。

LLNA の試験結果との比較が可能となるように、LLNA での評価結果が報告されている物質の中から選択した。既報の LLNA の結果から、非常に強い感作性物質のカテゴリーに属するものとして、2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB) および *p*-Phenylenediamine (pPDA) を、比較的強い感作性物質のカテゴリーに属するものとしてCinnamic aldehyde および Isoeugenolを、中程度の感作性物質のカテゴリーに属するものとしてEugenolおよび Abietic acid、Hexylcinnamic aldehyde (HCA)、Citral、Benzocaineを選択した。弱い感作性物質または刺激性物質としてPropylparabenおよびMethyl salicylate、Benzalkonium chloride (BzC) を評価に加えた。Benzalkonium chloride は、LLNAでリンパ球増殖活性があることが報告されている。DMF溶媒系での試験が報告されている感作性物質の中から、Imidazolidinyl ureaおよび 2-Mercaptobenzothiazol (MBT) を、DMSO溶媒系での試験が報告されている感作性物質であり、金属塩であるCoCl₂、NiSO₄を選択した。NiSO₄はLLNAでFalse negativeとなることが知られている。Trimellitic anhydride (TMA) は気道感作性として知られているが、LLNAでも陽性となる事が報告されている。

リストアップした被験物質について報告されている感作性試験の結果を表 5-2 に纏めた。

表5-1 被験物質リスト

Chemical name		CASRN	source	Lot No.
DNCB	2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	Wako	KSN7104
pPDA	4-Phenylenediamine	106-50-3	Wako	TCE4801
TMA, Trimellitic anhydride	1,2,4-Benzenetricarboxylic anhydride	552-30-7	Wako	TCH3765
Cinnamic aldehyde	3-Phenyl-2-propenal	104-55-2	Wako	TCJ3382
Isoeugenol	2-methoxy-4-propenylphenol	97-54-1	Wako	ELM5079
Eugenol	4-allyl-2-methoxyphenol	97-53-0	Wako	TCM7002
Benzocaine	Ethyl 4-aminobenzoate	94-09-7	Sigma-Aldrich	A7047
Abietic acid		514-10-3	Wako	LDQ0632
HCA	Hexyl cinnamic aldehyde	101-86-0	Wako	SEN5254
Citral	3,7-Dimethyl-2,6-octadienal	5392-40-5	Wako	DWF1148
Imidazolidinyl urea	1,1'-Methylenebis[3-[3-(hydroxymethyl)-2,5-dioxo-4-imidazolidinyl]urea]	39236-46-9	ICN	70169
MBT	2-Mercaptobenzothiazol	149-30-4	Aldrich	10315HU
CoCl ₂	Cobalt (II) chloride	7646-79-9	Wako	WAG3407
NiSO ₄	Nickel (II) sulfate hexahydrate	10101-97-0	Wako	CKQ3174
Propylparaben	Propyl 4-hydroxybenzoate	94-13-3	Wako	WAG1323
Methyl salicylate		119-36-8	Wako	TCF4726
BzC	Benzalkonium chloride	8001-54-5	ICN	3813F

Wako: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 和光純薬工業株式会社

ICN: ICN Biomedicals Inc.

Sigma-Aldrich: Sigma Aldrich Japan. シグマアルドリッヂジャパン株式会社

Aldrich: Aldrich Chemical Company, Inc.

表5-2 被験物質の感作性試験結果

Chemical name	LLNA	GPMT/BA	HMT	HPTA	Reference
DNCB	+	+			1)
pPDA	+	+	+	+	1)
Trimellitic anhydride	+	+			2)
Cinnamic aldehyde	+	+	+	+	1)
Isoeugenol	+	+		+	1)
Eugenol	+	+		+	1)
Benzocaine	+/-	+	+/-		1)
Abietic acid	+	+		+	1)
HCA	+	+			1)
Citral	+	+	+		1)
Imidazolidinyl urea	+	+		+	1)
MBT	+	+	+	+	1)
CoCl ₂	+	+	+	+	1)
NiSO ₄	-	+	+	+	1)
Propyl paraben	-	-	+/-	+	1)
Methyl salicylate	-	-	-		1)
Benzalkonium chloride	-	-		+	1)

1) K. E. Haneke, *et al.*, *Reg. Toxicol. Pharmacol.* (2001) **34**, 274–2862) D. A. Basketter, *et al.*, *Fd Chem. Toxicol.* (1992) **30**, 65–69

資料6) LLNA-DA 試験結果

一検討した被験物質の *in vivo* 及び *in vitro* 試験結果に関する資料

17検体の LLNA-DA の評価結果を以下に記載する。試験した被験物質は既に LLNA での評価結果が報告されており、それと比較する目的もあるため、Vehicle および用量の設定は、既報の文献情報を基に行った。

6-6-2 を除く全ての試験は、本試験は Day 1、Day2、Day3、Day7 に投与を行い、Day8 に摘出および測定を行った。6-6-2 のみ Day 1、Day2、Day3、Day6 に投与を行い、Day7 に摘出および測定を行った。

判定結果の一覧は表 6-18 に纏め、LLNA、GPMT/BA、HMT、HPTA の文献データと対比させた。また、ATP の SI 値を指標とした EC₅₀ の一覧は表 6-19 に纏め、LLNA、GPMT の文献データと対比させた。

6-1 DNBC の試験結果

DNBC の LLNA-DA による評価結果を表 6-1 および図 6-1 に示す。

Vehicle は AOO (acetone/olive oil (4:1, v/v)) を用いた。

0.1%以上の用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。0.05%から 0.5%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

0.025%～0.05%では用量依存性は認められなかった。0.5%以上の用量では耳介での刺激性と見られる変化が観察された。

Vehicle 群の No.2 の動物の ATP 発光量は異常に高い値を示した。ATP の測定に不備があったものと考えられるため、データから省いた。

DNBC の判定結果は陽性である。

EC₅₀=0.05% (0.05%および 0.1%の 2 用量群の ATP を指標とする SI 値より求めた)。

6-2 pPDA の試験結果

pPDA の LLNA-DA による評価結果を表 6-2 および図 6-2 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

15%用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。0.05%から 15%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

pPDA の判定は陽性である。

EC₅₀=0.35% (0.25%および 15%の 2 用量群の ATP を指標とする SI 値より求めた)。

6-3 TMA の試験結果

TMA の LLNA-DA による評価結果を表 6-3 および図 6-3 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

用量設定をプロトコールに規定する以前に実施した結果であるため、用量設定がプロトコールとは異なる。

1.5%以上の用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。0.15%から 15%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

用量設定に問題があるが、TMA の判定が陽性であることは明らかである。

$EC_3=0.20\%$ (0.15%および 1.5%の 2 用量群の ATP を指標とする SI 値より求めた)。

6-4 Cinnamic aldehyde の試験結果

Cinnamic aldehyde の LLNA-DA による評価結果を表 6-4 および図 6-4 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

5%以上の用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。1%から 15%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

Cinnamic aldehyde の判定は陽性である。

$EC_3=2.98\%$ (2.5%および 5%の 2 用量群の ATP を指標とする SI 値より求めた)。

6-5 Isoeugenol の試験結果

Isoeugenol について LLNA-DA により独立した 3 回の評価を行った。

6-5-1

Isoeugenol Exp. 1 の評価結果を表 6-5-1 および図 6-5-1 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

5%以上の用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。0.5%から 25%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

25%～50%では用量依存性は認められなかった。

Vehicle 群の No.2 の動物の ATP 発光量は異常に高い値を示した。ATP の測定に不備があったものと考えられるため、データから省いた。

25%および 50%投与群の ATP 発光量は非常に高い値を示している。Exp. 2 と比較するとリンパ節重量の値はほぼ再現性があるのに対し、ATP 発光量ではばらつきが大きい。この用量域ではリンパ節重量が 20mg 前後に達し、組織の懸濁に用いる PBS の量が 500 μ L であるため懸濁液の濃度は非常に高いと考えられる。そのことが ATP 測定の精度を下げている要因と思われる。

Isoeugenol の判定は陽性である。

$EC_3=3.40\%$ (2.5%および 5%の 2 用量群の ATP を指標とする SI 値より求めた)。

6-5-2

Isoeugenol Exp. 2 の評価結果を表 6-5-2 および図 6-5-2 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

2.5%以上の用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。2.5%から 25%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

25%～50%では用量依存性は認められなかった。

Isoeugenol の判定は陽性である。

$EC_3=2.28\%$ (2.5%および 5%の 2 用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。最低用量の 2.5%投与群でSI値が 3 を超えたため、SI値が 3 に最も近い 2 用量を選択した。
2.5%投与群のSI値は 3.11%、5%投与群のSI値は 4.39%である。

6-5-3

Isoeugenol Exp. 3 の評価結果を表 6-5-3 および図 6-5-3 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

2.5%用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。0.5%から 2.5%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

1%投与群の 1 匹が、Day7 投与終了後から Day8 の体重測定までの間に死亡した。2.5%投与群の動物に異常が認められなかつたため、毒性によるものとは考えられない。リンパ節重量および ATP 発光量の測定は同様に行つたが、データからは省いた。

Isoeugenol の判定は陽性である。

$EC_3=2.46\%$ (1%および 2.5%の 2 用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。

6-6 Eugenol の試験結果

Eugenol について LLNA-DA により独立した 3 回の評価を行つた。

6-6-1

Eugenol Exp. 1 の評価結果を表 6-6-1 および図 6-6-1 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

10%以上の用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。5%から 25%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

被験物質が Eugenol であり、10%用量を設定している事から、陽性対照は設けなかつた。

Eugenol の判定は陽性である。

$EC_3=5.09\%$ (5%および 10%の 2 用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。

6-6-2

Eugenol Exp. 2 の評価結果を表 6-6-2 および図 6-6-2 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

本試験は Day 1、Day2、Day3、Day6 に投与を行い、Day 7 に摘出および測定を行った。

10%以上の用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。5%から 25%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

被験物質が Eugenol であり、10%用量を設定している事から、陽性対照は設けなかった。

Eugenol の判定は陽性である。

EC₅₀=5.59% (5%および 10%の 2 用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。

6-6-3

Eugenol Exp. 3 の評価結果を表 6-6-3 および図 6-6-3 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

5%以上の用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。5%から 25%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

被験物質が Eugenol であり、10%用量を設定している事から、陽性対照は設けなかった。

Eugenol の判定は陽性である。

EC₅₀=4.23% (5%および 10%の 2 用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。最低用量の 5%投与群でSI値が 3 を超えたため、SI値が 3 に最も近い 2 用量を選択した。5%投与群のSI値は 3.24%、10%投与群のSI値は 4.79%である。

6-7 Benzocaine の試験結果

Benzocaine の LLNA-DA による評価結果を表 6-7 および図 6-7 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

10%以上の用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。5%から 25%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

リンパ節重量については 10%～25%の用量域で用量依存性が見られなかった。また試験群の ATP 発光量は個体差が大きいという特徴が認められる。

Benzocaine の判定は陽性である。

EC₅₀=6.57% (5%および 10%の 2 用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。

6-8 Abietic acid の試験結果

Abietic acid の LLNA-DA による評価結果を表 6-8 および図 6-8 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

10%以上の用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。5%から 25%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

Abietic acid の判定は陽性である。

EC₅₀=7.90% (5%および10%の2用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。

6-9 Hexylcinnamic aldehyde (HCA) の試験結果

HCA の LLNA-DA による評価結果を表 6-9 および図 6-9 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

25%用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。5%から 25%の用量範囲で濃度依存的な增加が確認された。

HCA の判定は陽性である。

EC₅₀=11.6% (10%および25%の2用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。

6-10 Citral の試験結果

Citral の LLNA-DA による評価結果を表 6-10 および図 6-10 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

25%用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。5%から 25%の用量範囲で濃度依存的な增加が確認された。

Citral の判定は陽性である。

EC₅₀=15.6% (15%および25%の2用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。

6-11 Imidazolidinyl urea の試験結果

Imidazolidinyl urea の LLNA-DA による評価結果を表 6-11 および図 6-11 に示す。

Vehicle は DMF (Dimethylformamide) を用いた。

25%以上の用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。10%から 50%の用量範囲で濃度依存的な增加が確認された。

50%用量では耳介付近の脱毛が観察され、表皮への何らかの作用と考えられる。

10%Eugenol の DMF 溶液 (P. C. 1) は充分な反応が得られなかつたが、同時に試験した 10%Eugenol の AOO 溶液 (P. C. 2) では充分な反応が認められた。

Eugenol が DMF 中では充分な反応を示さない場合には再現性があり (データには示さない)、DMF が Vehicle の試験では Eugenol は適切な陽性対照ではないといえる。

Imidazolidinyl urea の判定は陽性である。

EC₅₀=18.8% (10%および25%の2用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。

6-12 2-Mercaptobenzothiazol (MBT) の試験結果

MBT の LLNA-DA による評価結果を表 6-12 および図 6-12 に示す。

Vehicle は DMF を用いた。

試験した全ての用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えなかつた。10%用量の ATP

発光量で Vehicle に対する有意な増加が認められたが、用量依存性は認められない。
同時に試験した 10%Eugenol の AOO 溶液 (P. C. 2) では充分な反応が認められた。
本試験条件において、MBT は陰性と判定した。

6-13 CoCl₂の試験結果

CoCl₂のLLNA-DAによる評価結果を表 6-13 および図 6-13 に示す。

Vehicle は DMSO (Dimethylsulfoxide) を用いた。

5%用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。1%から 5%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

DMSO 投与群は AOO 群に対し、リンパ節重量、ATP 発光量がそれぞれ有意に高い。DMSO はリンパ球の増殖を促す効果があると考えられる。陽性対照として設定した 10% Eugenol の AOO 溶液 (P. C. 2) では充分な反応が認められた。10% Eugenol の DMSO 溶液 (P. C. 1) のリンパ節重量、ATP 発光量の平均値は P. C. 2 と比較して下回るもの、有意な差ではない。しかしながら、SI 値は 3 を超えなかった。

CoCl₂の判定は陽性である。

EC₃=3.27% (2.5%および5%の 2 用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。

6-14 NiSO₄の試験結果

NiSO₄のLLNA-DAによる評価結果を表 6-14 および図 6-14 に示す。

Vehicle は DMSO を用いた。

検体として 6 水和物を用い、試験液は NiSO₄ としての濃度に調製した。

試験した全ての用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えなかった。全ての用量群のリンパ節重量、ATP 発光量の平均値は Vehicle 群に対して増加が認められ、その幾つかは有意差も認められるが、用量依存性は認められなかった。

10%Eugenol の AOO 溶液 (P. C. 2) では充分な反応が認められた。

本試験条件において、NiSO₄ は陰性と判定した。

6-15 Propylparaben の試験結果

Propylparaben の LLNA-DA による評価結果を表 6-15 および図 6-15 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

試験した全ての用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えなかった。

10%Eugenol の AOO 溶液 (P. C.) では充分な反応が認められた。

本試験条件において、Propylparaben は陰性と判定した。

6-16 Methyl salicylate の試験結果

Methyl salicylate の LLNA-DA による評価結果を表 6-16 および図 6-16 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

試験した全ての用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えなかつた。

10%Eugenol の AOO 溶液 (P. C.) では充分な反応が認められた。

本試験条件において、Methyl salicylate は陰性と判定した。

6-17 Benzalkonium chloride の試験結果

Benzalkonium chloride の LLNA-DA による評価結果を表 6-17 および図 6-17 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

1%および 2.5%用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。試験した全ての用量群のリンパ節重量、ATP 発光量の平均値は、Vehicle 群に対して明確な増加が認められる。

2.5%以上の用量では耳介での刺激性と見られる変化が観察された。特に 5%では肥大が著しい。

Vehicle 群の 1 匹が麻酔操作のミスにより死亡し、n=2 となつたため、有意差検定は行わなかつた。残る 2 匹によるリンパ節重量、ATP 発光量の平均値は AOO 群として妥当な値である。

リンパ節重量、ATP 発光量共に、SI 値の用量依存性は認められなかつた。

結果に疑いが持たれるものの、2 用量で SI 値が 3 を超えていることから、Benzalkonium chloride は陽性と判定した。

用量依存性が認められないため、EC₅₀の算出は行わなかつた。

6-18 判定結果の纏め

判定結果の一覧を表 6-18 に纏めた。LLNA、GPMT/BA、HMT、HPTA の文献データと対比したところ、概ね一致する結果が得られている。

6-19 EC₅₀の纏め

ATP の SI 値を指標とした EC₅₀の一覧を表 6-19 に纏めた。LLNA の文献より引用したデータと比較したところ、ほぼ一致する結果となつてゐる。

表6-1 LLNA-DA試験結果 (2,4-Dinitrochlorobenzene、DNCB) Vehicle;AOO(acetone/olive oil(4:1,v/v))、P. C.;Eugenol 10%/AOO。
p値はt検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 10W

投与開始日: 2003年9月10日

摘出・測定日: 2003年9月17日

※ATP測定における不備があったものと思われるため、データから省く。

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p値
Vehicle	23.7	2.99	3.35	0.73	1.00	-	1453	2975	1611	1.00	-
	24.0	4.15					11748※				
	23.3	3.74					4663				
	25.0	2.53					2810				
P. C.	23.6	7.51	10.26	2.04	3.06	p<0.01	13351	17292	6621	5.81	p<0.05
	22.4	12.44					27023				
	24.5	10.52					15905				
	22.3	10.57					12892				
DNCB 0.025%	22.1	8.80	6.87	1.68	2.05	p<0.05	11884	9610	3321	3.23	p<0.05
	24.7	6.13					11146				
	22.8	5.69					5799				
DNCB 0.05%	23.4	6.85	6.88	0.20	2.05	p<0.01	10848	8903	1768	2.99	p<0.05
	24.8	7.09					7394				
	23.1	6.70					8468				
DNCB 0.1%	22.4	8.73	8.05	0.64	2.40	p<0.01	13205	9541	3318	3.21	p<0.05
	23.7	7.96					8679				
	21.9	7.45					6740				
DNCB 0.25%	26.1	21.93	19.65	2.42	5.86	p<0.01	34300	25618	9402	8.61	p<0.05
	21.0	19.91					26924				
	20.4	17.11					15631				
DNCB 0.5%	25.3	23.94	26.11	2.41	7.79	p<0.01	33092	36673	8788	12.33	p<0.01
	23.3	25.70					46685				
	25.0	28.70					30241				
DNCB 1%	24.6	34.00	32.83	1.46	9.79	p<0.01	40795	36682	4177	12.33	p<0.01
	24.0	33.31					36807				
	22.0	31.19					32445				

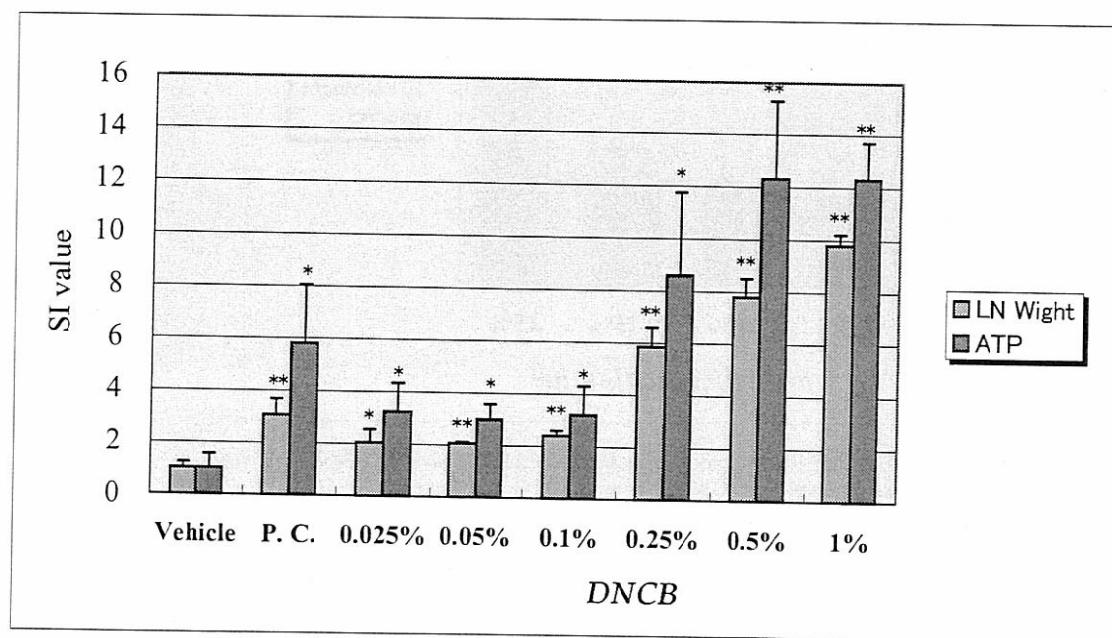


図6-1 DA-LLNA試験における2,4-Dinitrochlorobenzene(DNCB)のリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S.D.、* p<0.05、** p<0.01。Vehicle;AOO、P. C.; Eugenol 10%/AOO。

表6-2 LLNA-DA試験結果 (*p*-Phenylenediamine、pPDA) Vehicle; AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ; Eugenol 10%/AOO。
 p 値はt検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 10W

投与開始日: 2003年7月2日

摘出・測定日: 2003年7月9日

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p 値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p 値
Vehicle	22.7	4.19	4.55	0.33	1.00	-	4927	4411	753	1.00	-
	23.2	4.63					3547				
	24.9	4.83					4758				
P. C.	24.4	10.89	9.21	1.46	2.02	$p < 0.01$	17020	14388	2471	3.26	$p < 0.01$
	21.8	8.24					14029				
	23.7	8.50					12117				
pPDA 0.05%	23.0	7.74	6.61	1.16	1.45	$p < 0.05$	11478	7431	3549	1.68	
	23.0	5.42					4851				
	23.8	6.68					5964				
pPDA 0.1%	23.7	7.76	7.39	1.18	1.62	$p < 0.05$	10227	8793	2100	1.99	$p < 0.05$
	25.4	6.07					6383				
	23.5	8.34					9770				
pPDA 0.25%	22.8	10.03	9.82	0.40	2.16	$p < 0.01$	13459	11490	3472	2.61	$p < 0.05$
	23.6	10.07					13529				
	24.1	9.36					7481				
pPDA 15%	24.2	14.41	17.02	2.46	3.74	$p < 0.05$	16950	25206	8185	5.72	$p < 0.05$
	25.6	17.35					25352				
	21.3	19.29					33318				

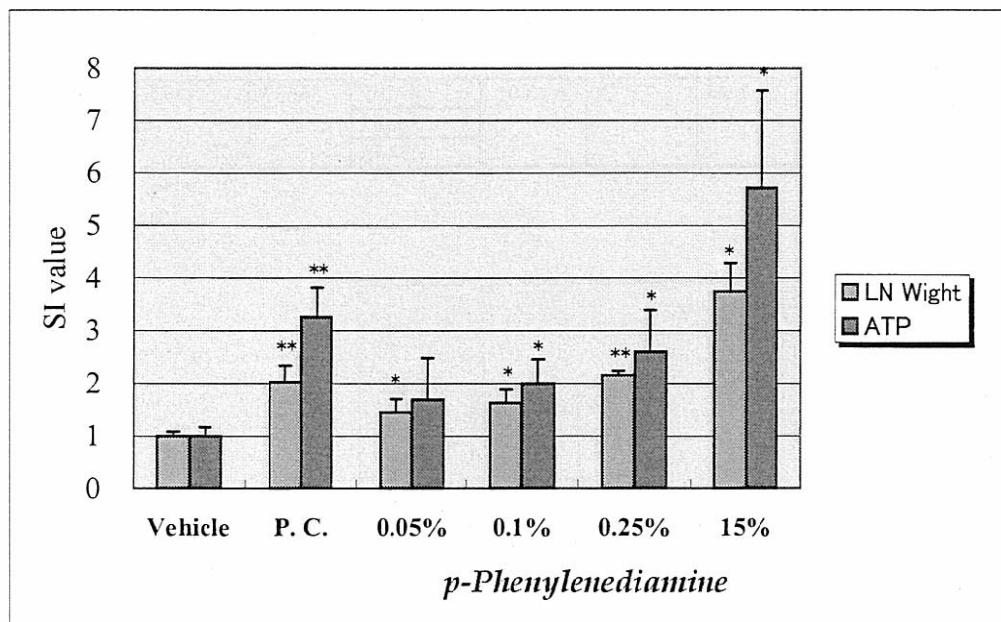


図6-2 DA-LLNA試験における*p*-Phenylenediamineのリンパ節重量およびATP量の増加率。
 値は平均±S. D.、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。Vehicle; AOO、P. C. ; Eugenol 10%/AOO。

表6-3 LLNA-DA試験結果 (Trimellitic anhydride、TMA) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。
 p 値は t 検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 10W

投与開始日: 2003年6月4日

摘出・測定日: 2003年6月11日

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p 値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p 値
Vehicle	23.3	3.76	3.73	0.15	1.00	-	2518	2637	375	1.00	-
	23.5	3.80					2815				
	22.5	3.52					3040				
	24.2	3.85					2175				
P. C.	24.0	7.33	8.10	1.11	2.17	$p < 0.05$	14306	11193	3638	4.24	
	22.2	9.37					12080				
	22.7	7.59					7194				
TMA 0.15%	23.7	5.62	6.21	0.82	1.66	$p < 0.05$	4364	6922	2639	2.62	
	23.6	5.87					9635				
	25.0	7.14					6768				
TMA 1.5%	23.8	16.46	15.09	1.77	4.04	$p < 0.01$	40072	31784	7834	12.05	$p < 0.05$
	22.1	15.71					30779				
	22.4	13.09					24501				
TMA 15%	22.1	29.98	27.28	2.34	7.31	$p < 0.01$	65230	55493	8895	21.04	$p < 0.01$
	24.1	25.86					53458				
	20.6	25.99					47792				

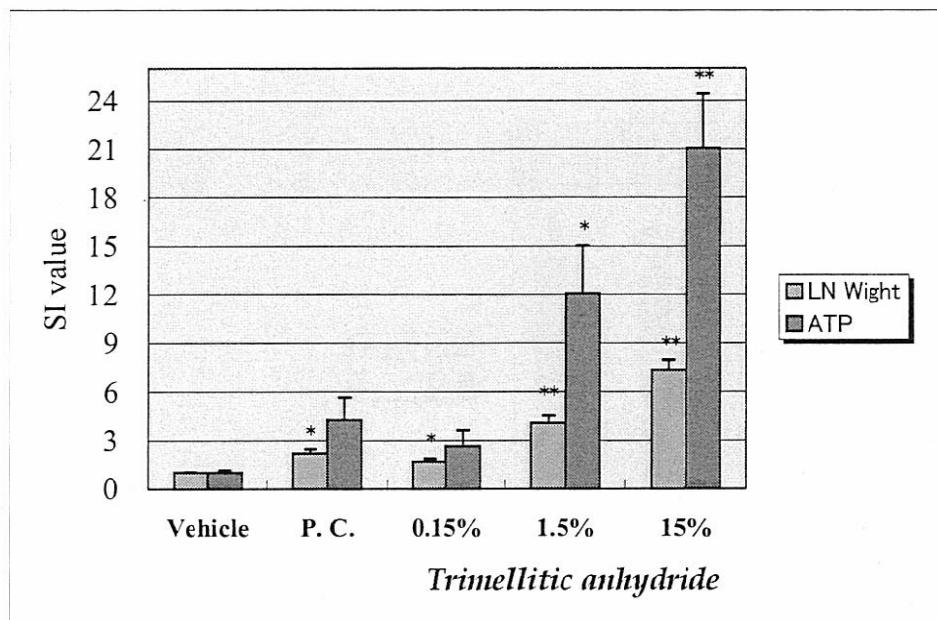


図6-3 DA-LLNA試験におけるTrimellitic anhydrideのリンパ節重量およびATP量の増加率。
 値は平均±S. D.、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。Vehicle;AOO、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。

表6-4 LLNA-DA試験結果 (Cinnamic aldehyde) Vehicle; AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ; Eugenol 10%/AOO。

p 値は t 検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 10W

投与開始日: 2003年7月2日

摘出・測定日: 2003年7月9日

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p 値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p 値
Vehicle	22.7	4.19	4.55	0.33	1.00	-	4927	4411	753	1.00	-
	23.2	4.63					3547				
	24.9	4.83					4758				
P. C.	24.4	10.89	9.21	1.46	2.02	$p < 0.01$	17020	14388	2471	3.26	$p < 0.01$
	21.8	8.24					14029				
	23.7	8.50					12117				
Cinnamic aldehyde 1%	22.3	5.98	7.34	1.28	1.61	$p < 0.05$	6780	9199	3547	2.09	
	21.7	8.52					13271				
	23.8	7.53					7545				
Cinnamic aldehyde 2.5%	23.6	9.63	8.86	0.92	1.95	$p < 0.01$	13624	11743	2487	2.66	$p < 0.01$
	21.5	7.84					8924				
	22.2	9.11					12681				
Cinnamic aldehyde 5%	21.4	12.36	11.86	0.50	2.61	$p < 0.01$	21975	19502	2344	4.42	$p < 0.01$
	24.9	11.36					17313				
	21.5	11.87					19218				
Cinnamic aldehyde 15%	24.3	15.29	16.74	2.38	3.68	$p < 0.05$	20037	20848	3245	4.73	$p < 0.01$
	24.2	15.44					18085				
	23.4	19.49					24421				

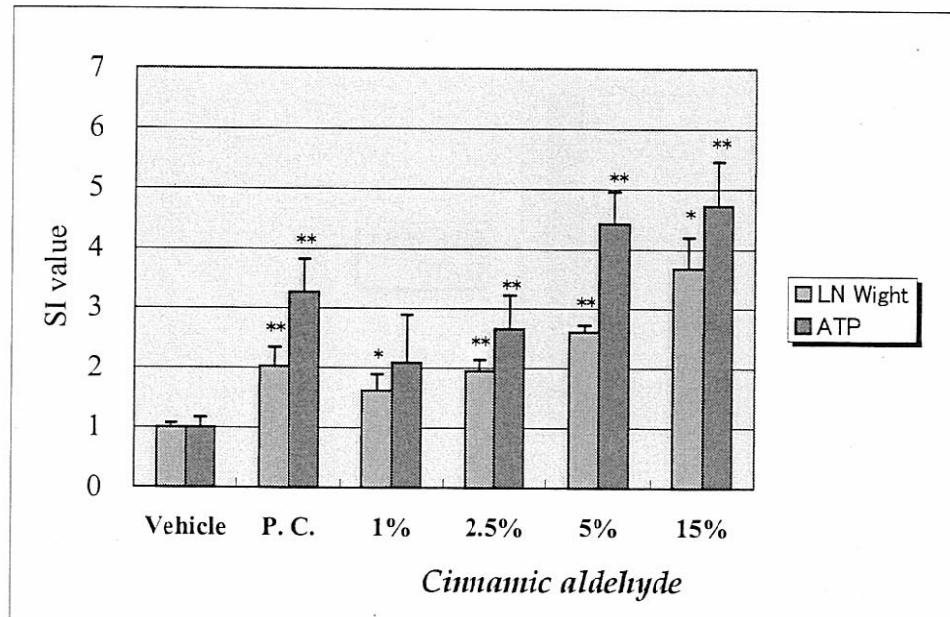


図6-4 DA-LLNA試験におけるCinnamic aldehydeのリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p < 0.05$ 、 ** $p < 0.01$ 。Vehicle; AOO、P. C. ; Eugenol 10%/AOO。

表6-5-1 LLNA-DA試験結果 (Isoeugenol Exp. 1) Vehicle;AOO (acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。
p値はt検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 10W

投与開始日: 2003年9月10日

摘出・測定日: 2003年9月17日

※ATP測定における不備があったものと思われるため、データから省く。

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p値
Vehicle	23.7	2.99	3.35	0.73	1.00	-	1453	2975	1611	1.00	-
	24.0	4.15					11748※				
	23.3	3.74					4663				
	25.0	2.53					2810				
P. C.	23.6	7.51	10.26	2.04	3.06	p < 0.01	13351	17292	6621	5.81	p < 0.05
	22.4	12.44					27023				
	24.5	10.52					15905				
	22.3	10.57					12892				
Isoeugenol 0.5%	25.7	6.84	6.08	1.09	1.81	p < 0.05	5273	4472	1594	1.50	
	26.3	6.56					5507				
	26.4	4.83					2636				
Isoeugenol 1%	24.6	8.28	7.20	1.12	2.15	p < 0.01	8506	6778	1773	2.28	
	24.7	6.04					4963				
	21.3	7.27					6866				
Isoeugenol 2.5%	22.0	8.66	8.74	0.10	2.61	p < 0.01	8514	8270	498	2.78	p < 0.01
	24.8	8.70					8600				
	25.1	8.85					7698				
Isoeugenol 5%	21.9	8.37	9.75	1.20	2.91	p < 0.01	8359	10087	2055	3.39	p < 0.01
	24.3	10.35					12359				
	24.6	10.53					9543				
Isoeugenol 10%	23.9	12.73	13.66	1.74	4.07	p < 0.01	20431	16913	3540	5.68	p < 0.01
	23.6	12.58					16956				
	23.3	15.66					13352				
Isoeugenol 25%	25.1	19.69	21.03	1.56	6.27	p < 0.01	94272	105988	57757	35.63	
	25.2	22.74					168705				
	26.6	20.65					54988				
Isoeugenol 50%	24.4	22.36	20.51	2.64	6.12	p < 0.01	90220	68166	19110	22.91	p < 0.05
	21.4	17.48					56484				
	24.8	21.68					57796				

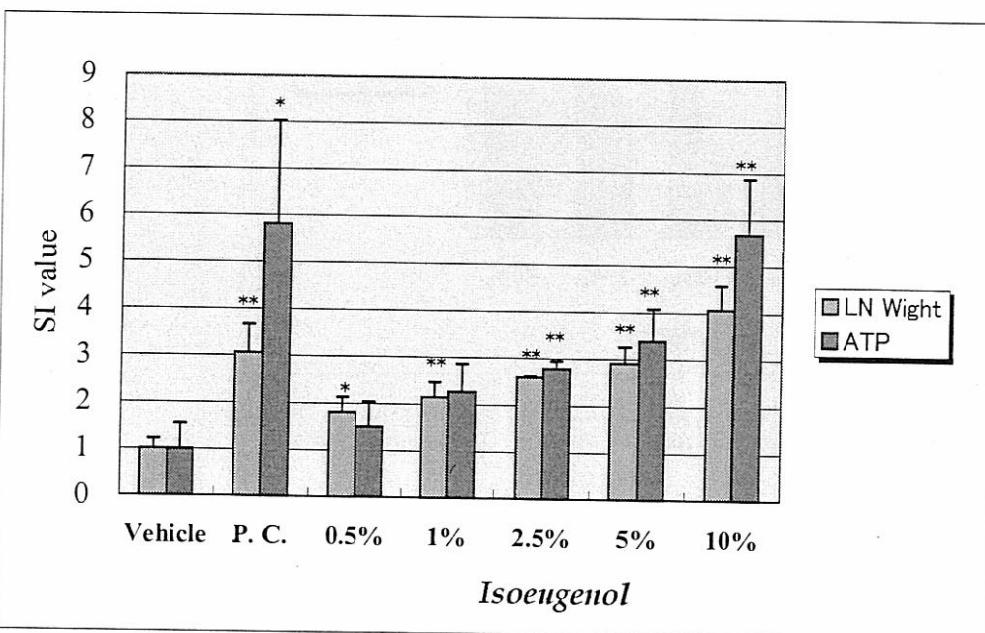


図6-5-1 DA-LLNA試験におけるIsoeugenol(Exp. 1)のリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S.D.、* p<0.05、** p<0.01。Vehicle;AOO、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。

表6-5-2 LLNA-DA試験結果 (Isoeugenol Exp. 2) Vehicle; AOO (acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C.; Eugenol 10%/AOO。
 p 値はt検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 9W

投与開始日: 2003年10月8日

摘出・測定日: 2003年10月15日

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p 値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p 値
Vehicle	23.8	4.18	4.19	0.01	1.00	-	1460	3528	1881	1.00	-
	24.0	4.20					5137				
	24.2	4.19					3988				
P. C.	24.8	9.52	10.61	1.25	2.53	$p < 0.05$	22813	24980	5267	7.08	$p < 0.01$
	22.8	10.34					21142				
	23.6	11.97					30985				
Isoeugenol 2.5%	22.2	7.86	6.73	1.07	1.61		15638	10982	4057	3.11	$p < 0.05$
	22.9	5.73					9113				
	23.0	6.59					8197				
Isoeugenol 5%	23.2	8.61	9.48	1.29	2.26	$p < 0.05$	15773	15473	4411	4.39	$p < 0.05$
	23.5	10.96					19726				
	24.4	8.88					10920				
Isoeugenol 10%	25.5	15.92	14.59	1.42	3.48	$p < 0.01$	24776	23869	805	6.77	$p < 0.01$
	24.7	13.10					23236				
	23.5	14.74					23595				
Isoeugenol 25%	25.1	22.08	21.72	0.59	5.18	$p < 0.01$	40328	43598	5920	12.36	$p < 0.01$
	24.0	22.03					50432				
	22.9	21.04					40035				
Isoeugenol 50%	24.1	19.43	20.31	2.63	4.85	$p < 0.01$	43389	37359	7894	10.59	$p < 0.01$
	22.2	18.24					28424				
	23.6	23.27					40263				

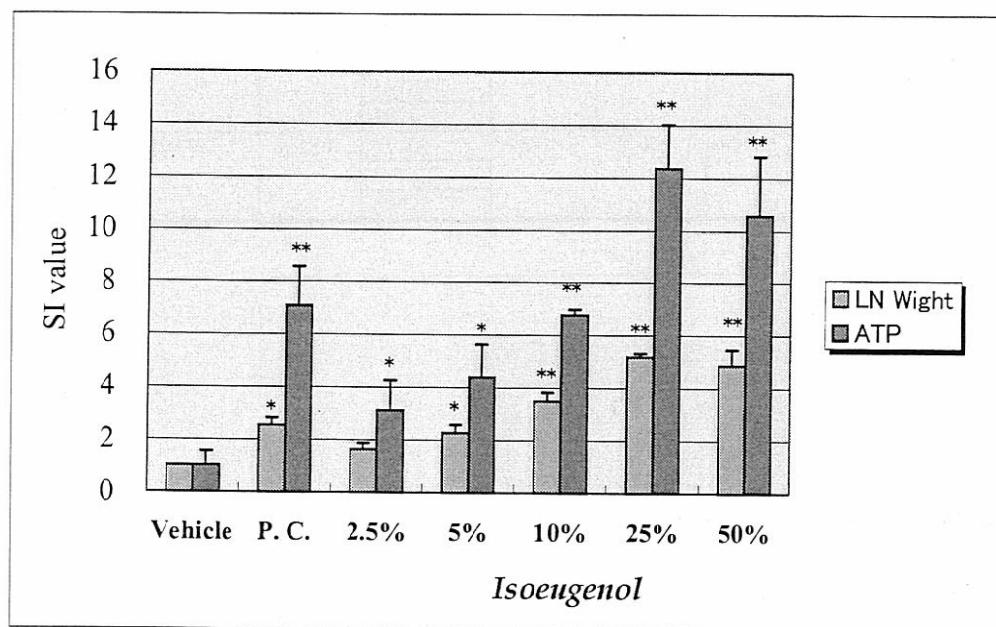


図6-5-2 DA-LLNA試験におけるIsoeugenol(Exp. 2)のリンパ節重量およびATP量の増加率。
 値は平均±S. D.、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。Vehicle; AOO、P. C.; Eugenol 10%/AOO。

表6-5-3 LLNA-DA試験結果 (Isoeugenol Exp. 3) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。
 p 値は t 検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢： 10W

投与開始日： 2003年6月25日

摘出・測定日： 2003年7月2日

※データから省く。1%投与群はn=2であるため有意差の検定は行わなかった。

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p 値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p 値
Vehicle	24.5	4.10	3.87	0.62	1.00	-	4418	3231	964	1.00	-
	23.1	4.21					2728				
	21.8	4.23					3557				
	20.8	2.95					2221				
P. C.	22.2	9.27	9.07	0.36	2.34	$p < 0.01$	15164	13709	1212	4.24	$p < 0.01$
	23.3	9.00					14162				
	22.8	9.41					12392				
	21.4	8.59					13118				
Isoeugenol 0.5%	20.9	4.19	4.23	0.53	1.09		4293	3929	422	1.22	
	23.1	4.78					4028				
	22.6	3.73					3467				
Isoeugenol 1%	21.6	7.26	6.79	0.67	1.75	N. D.	11270	8962	3264	2.77	N. D.
	22.1	6.31					6655				
	死亡	※6.31					※254				
Isoeugenol 2.5%	21.1	7.87	6.92	1.46	1.79	$p < 0.05$	12332	9712	3172	3.01	$p < 0.05$
	22.9	7.65					10619				
	20.4	5.24					6185				

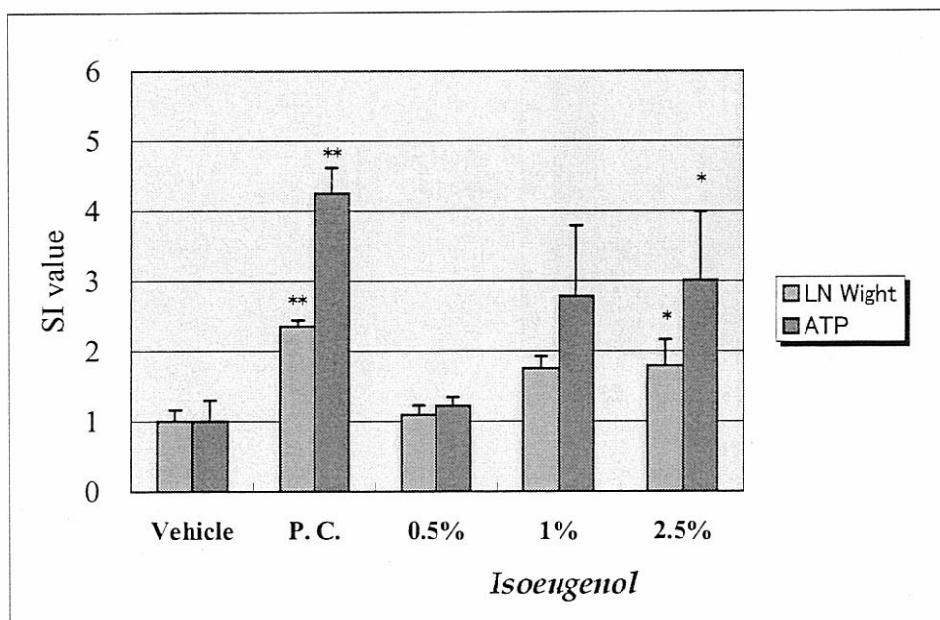


図6-5-3 DA-LLNA試験におけるIsoeugenol(Exp. 3)のリンパ節重量およびATP量の増加率。
 値は平均士S. D.、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。Vehicle;AOO、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。
 1%投与群で1匹が死亡し $n=2$ となったため、有意差検定は行わなかった。

表6-6-1 LLNA-DA試験結果 (Eugenol-Exp. 1) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))。

p 値は t 検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 10W

投与開始日: 2003年10月1日

摘出・測定日: 2003年10月8日

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p 値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p 値
Vehicle	25.6	3.90	3.79	0.27	1.00	-	2186	2474	416	1.00	-
	24.5	3.66					2177				
	23.8	3.50					2470				
	26.7	4.11					3064				
Eugenol 5%	26.6	5.96	7.17	2.61	1.89		6473	7226	2474	2.92	
	23.6	5.38					5215				
	24.2	10.17					9989				
Eugenol 10%	24.4	12.13	11.22	2.30	2.96	$p < 0.01$	25658	18180	6487	7.35	
	23.7	12.92					14074				
	24.5	8.60					14808				
Eugenol 25%	23.3	12.14	14.39	2.78	3.79	$p < 0.01$	19108	27022	8976	10.92	$p < 0.05$
	21.2	13.53					25183				
	23.3	17.49					36776				

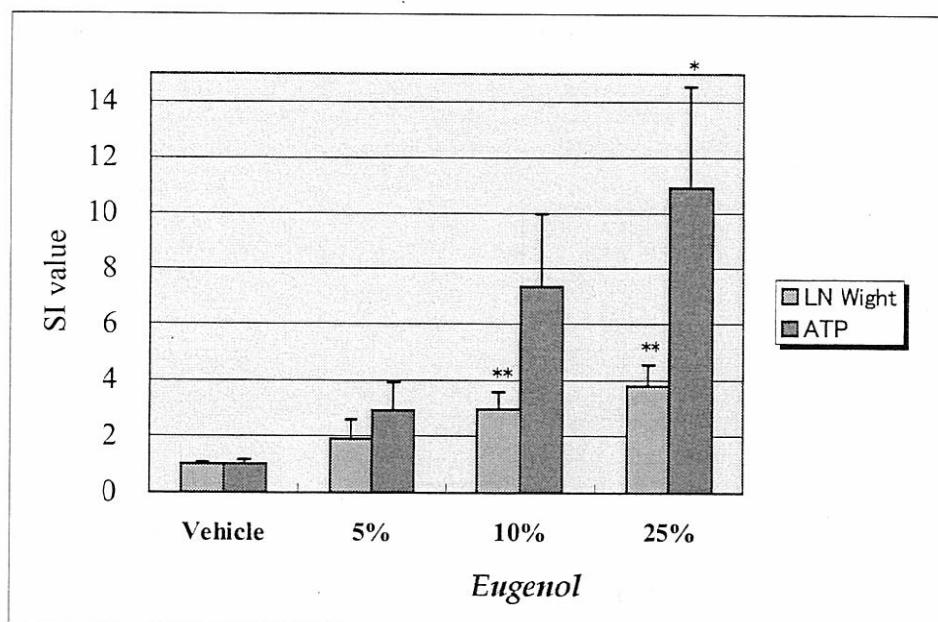


図6-6-1 DA-LLNA試験におけるEugenol(Exp. 1)のリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。Vehicle;AOO。

表6-6-2 LLNA-DA試験結果 (Eugenol-Exp. 2) Vehicle; AOO (acetone/olive oil (4:1, v/v))。
 p 値はt検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 10W

投与開始日: 2003年10月1日

摘出・測定日: 2003年10月7日

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p 値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p 値
Vehicle	26.6	4.23	4.25	0.25	1.00	-	2388	3207	554	1.00	-
	26.4	4.02					3530				
	23.5	4.14					3560				
	26.0	4.59					3351				
Eugenol 5%	22.9	8.63	7.26	1.61	1.71	$p < 0.01$	12648	8994	3456	2.80	$p < 0.05$
	26.5	7.66					8559				
	25.2	5.48					5777				
Eugenol 10%	24.2	11.87	10.45	1.29	2.46	$p < 0.01$	17950	14325	3139	4.47	$p < 0.05$
	25.1	9.34					12507				
	26.4	10.14					12520				
Eugenol 25%	26.1	14.54	14.63	0.16	3.45	$p < 0.01$	28932	18029	10277	5.62	$p < 0.05$
	24.1	14.54					8520				
	25.1	14.81					16636				

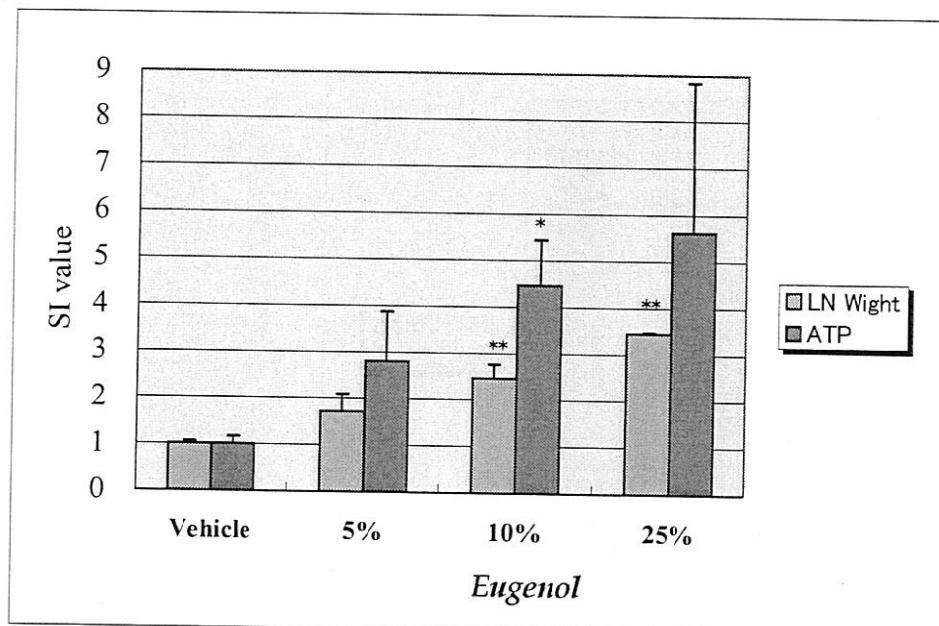


図6-6-2 DA-LLNA試験におけるEugenol(Exp. 2)のリンパ節重量およびATP量の増加率。
 \pm は平均±S. D.、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。Vehicle; AOO。

表6-6-3 LLNA-DA試験結果 (Eugenol-Exp. 3) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))。

p 値はt検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 9W

投与開始日: 2003年7月30日

摘出・測定日: 2003年8月6日

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p 値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p 値
Vehicle	24.8	4.51	4.37	0.23	1.00	-	3759	3871	344	1.00	-
	20.8	4.63					3995				
	21.3	4.18					3461				
	22.5	4.17					4269				
Eugenol 5%	21.7	7.19	7.32	0.31	1.67	$p < 0.01$	12594	12533	2714	3.24	$p < 0.05$
	21.5	7.68					15216				
	23.1	7.10					9790				
Eugenol 10%	22.3	9.07	10.19	1.56	2.33	$p < 0.01$	16624	18535	3636	4.79	$p < 0.01$
	25.2	12.35					23785				
	26.4	9.01					15667				
	21.3	10.31					18066				
Eugenol 25%	21.8	11.86	12.79	0.89	2.92	$p < 0.01$	26107	27372	1694	7.07	$p < 0.01$
	22.6	12.86					26713				
	21.9	13.64					29297				

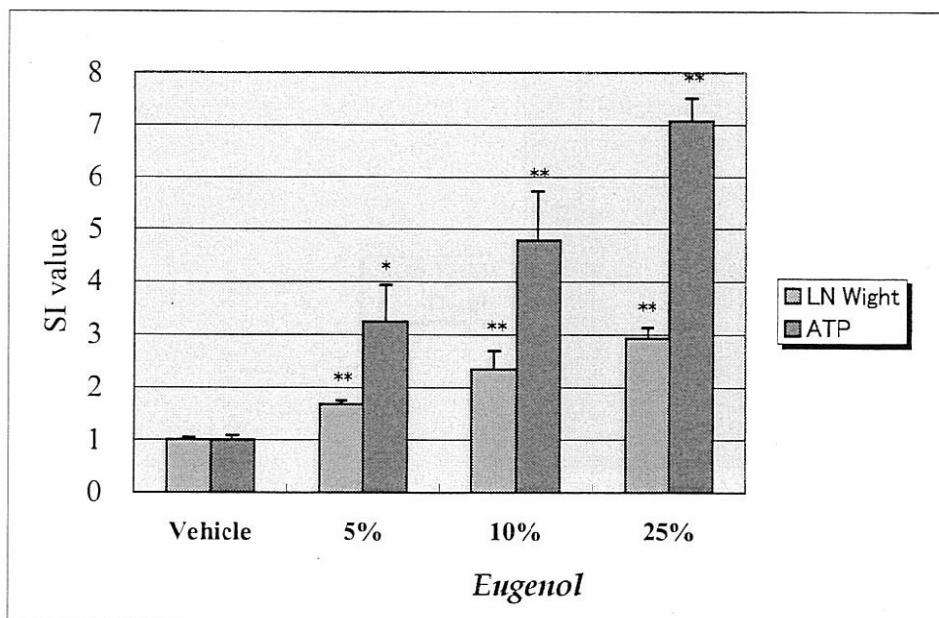


図6-6-3 DA-LLNA試験におけるEugenol(Exp. 3)のリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D., * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。Vehicle;AOO。

表6-7 LLNA-DA試験結果 (Benzocaine) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。

p 値はt検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 10W

投与開始日: 2003年9月3日

摘出・測定日: 2003年9月10日

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p 値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p 値
Vehicle	24.5	3.01	3.39	0.39	1.00	-	2660	2580	518	1.00	-
	25.6	3.71					2856				
	24.0	3.09					1828				
	25.6	3.74					2975				
P. C.	21.9	10.80	9.29	1.20	2.74	$p < 0.01$	19298	15859	3223	6.15	$p < 0.01$
	22.1	9.44					17360				
	22.3	9.04					14953				
	23.6	7.89					11827				
Benzocaine 5%	25.1	6.92	5.94	1.09	1.75	$p < 0.01$	10495	6766	3722	2.62	
	25.6	4.76					3052				
	24.1	6.14					6751				
Benzocaine 10%	22.6	6.69	7.12	0.78	2.10	$p < 0.01$	10314	9857	1312	3.82	$p < 0.01$
	21.3	8.02					10880				
	23.3	6.64					8378				
Benzocaine 25%	24.4	6.41	6.72	0.78	1.98	$p < 0.01$	10512	12480	6887	4.84	
	24.6	6.14					6793				
	24.7	7.60					20137				

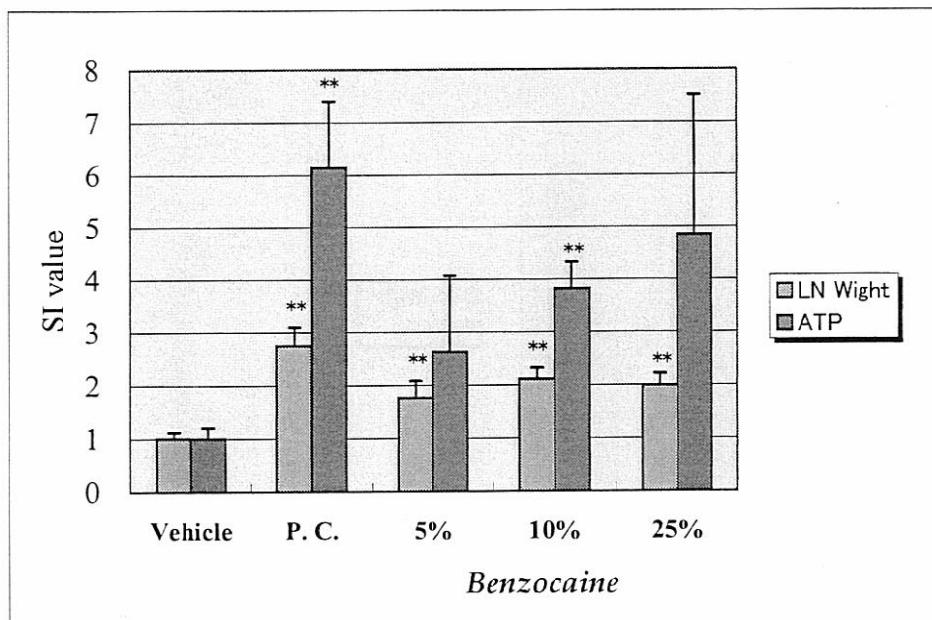


図6-7 DA-LLNA試験におけるBenzocaineのリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。Vehicle;AOO、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。

表6-8 LLNA-DA試験結果 (Abietic acid) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。
 p 値は t 検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 10W

投与開始日: 2003年8月27日

摘出・測定日: 2003年9月3日

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p 値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p 値
Vehicle	22.7	3.80	3.83	0.17	1.00	-	3529	3014	436	1.00	-
	24.3	4.04					3106				
	21.7	3.85					2949				
	24.4	3.63					2473				
P. C.	25.3	11.21	9.59	1.35	2.50	$p < 0.01$	20105	15535	3114	5.15	$p < 0.01$
	25.7	8.46					14663				
	24.6	10.18					14233				
	25.3	8.50					13137				
Abietic acid 5%	23.4	5.19	5.87	0.73	1.53	$p < 0.05$	4143	6752	2472	2.24	
	19.6	5.79					9059				
	24.1	6.64					7056				
Abietic acid 10%	23.6	7.70	7.55	0.13	1.97	$p < 0.01$	13190	10701	2421	3.55	$p < 0.05$
	24.8	7.44					8354				
	24.0	7.52					10561				
Abietic acid 25%	23.7	11.19	11.28	0.24	2.95	$p < 0.01$	20693	18857	1793	6.26	$p < 0.01$
	23.3	11.10					17109				
	22.5	11.55					18770				

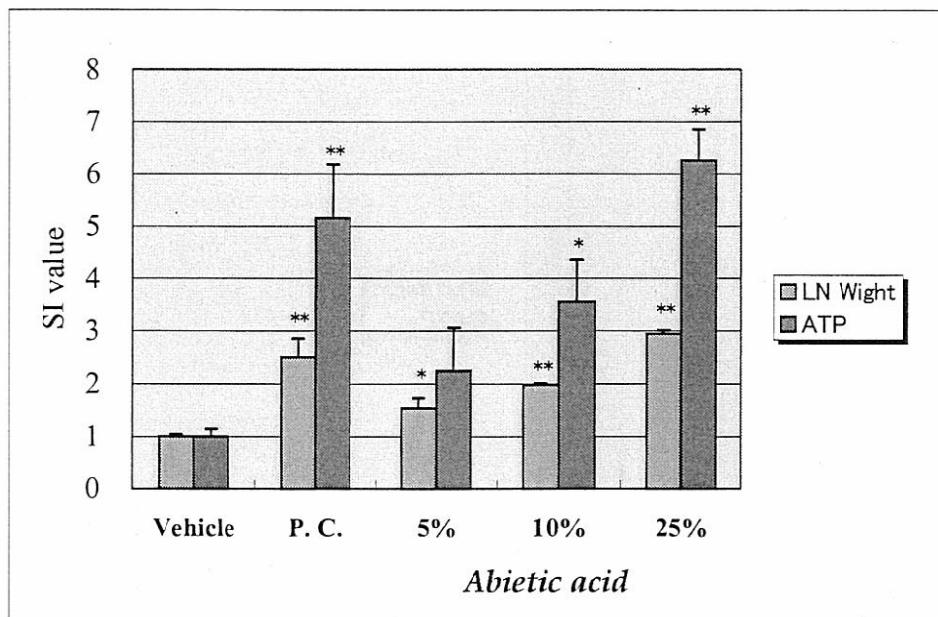


図6-8 DA-LLNA試験におけるAbietic acidのリンパ節重量およびATP量の増加率。
 値は平均±S. D.、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。Vehicle;AOO、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。

表6-9 LLNA-DA試験結果 (Hexylcinnamic aldehyde、HCA) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。
 p 値はt検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢： 9W

投与開始日： 2003年7月30日

摘出・測定日： 2003年8月6日

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p 値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p 値
Vehicle	24.8	4.51	4.37	0.23	1.00	-	3759	3871	344	1.00	-
	20.8	4.63					3995				
	21.3	4.18					3461				
	22.5	4.17					4269				
P. C.	22.3	9.07	10.19	1.56	2.33	$p < 0.01$	16624	18535	3636	4.79	$p < 0.01$
	25.2	12.35					23785				
	26.4	9.01					15667				
	21.3	10.31					18066				
HCA 5%	21.6	5.62	4.69	0.87	1.07		7375	5005	2053	1.29	
	21.2	3.90					3858				
	21.0	4.56					3782				
HCA 10%	23.4	8.38	7.94	1.01	1.82	$p < 0.05$	9217	9981	2384	2.58	$p < 0.05$
	22.0	8.65					12654				
	21.6	6.78					8072				
HCA 25%	19.8	12.55	12.84	1.17	2.94	$p < 0.01$	30420	25038	7083	6.47	$p < 0.05$
	21.9	14.13					27682				
	20.5	11.85					17014				

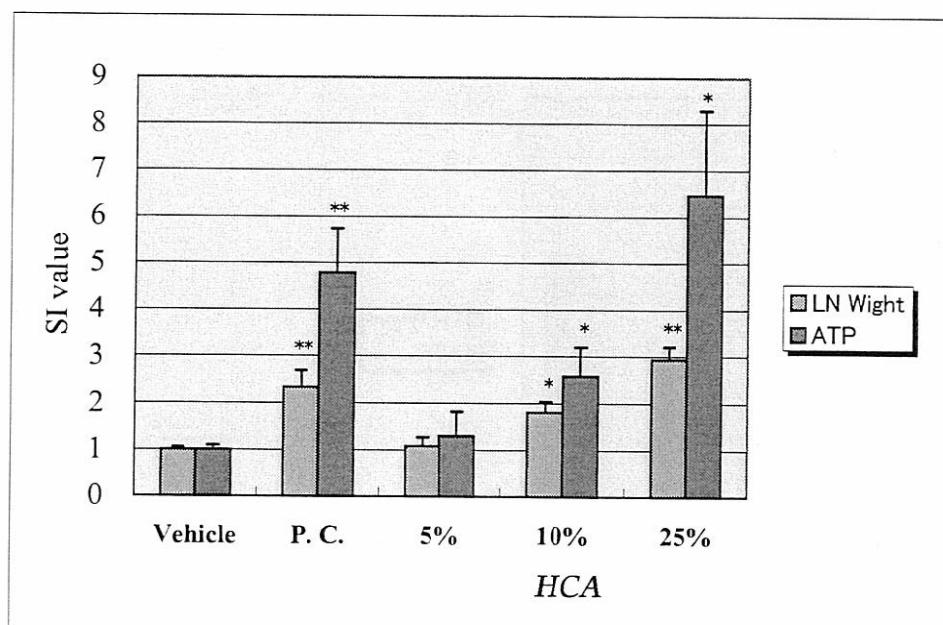


図6-9 DA-LLNA試験におけるHexylcinnamic aldehyde(HCA)のリンパ節重量およびATP量の増加率。
 値は平均±S. D.、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。Vehicle;AOO、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。

表6-10 LLNA-DA試験結果 (Citral) Vehicle;AOO溶媒(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。
 p 値はt検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 10W

投与開始日: 2003年7月2日

摘出・測定日: 2003年7月9日

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p 値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p 値
Vehicle	22.7	4.19	4.55	0.33	1.00	-	4927	4411	753	1.00	-
	23.2	4.63					3547				
	24.9	4.83					4758				
P. C.	24.4	10.89	9.21	1.46	2.02	$p < 0.01$	17020	14388	2471	3.26	$p < 0.01$
	21.8	8.24					14029				
	23.7	8.50					12117				
Citral 5%	25.2	7.80	8.19	1.65	1.80	$p < 0.05$	9191	8706	3680	1.97	
	22.9	10.00					12120				
	25.8	6.78					4808				
Citral 10%	20.8	10.10	9.65	1.28	2.12	$p < 0.01$	9937	9304	1635	2.11	$p < 0.01$
	24.1	8.21					7447				
	26.8	10.65					10528				
Citral 15%	23.1	10.32	11.22	1.31	2.47	$p < 0.01$	12297	12814	1290	2.91	$p < 0.01$
	22.0	10.62					11863				
	22.7	12.72					14283				
Citral 25%	21.3	10.28	13.29	2.66	2.92	$p < 0.05$	18200	19426	2781	4.40	$p < 0.01$
	21.9	14.27					22609				
	24.7	15.33					17469				

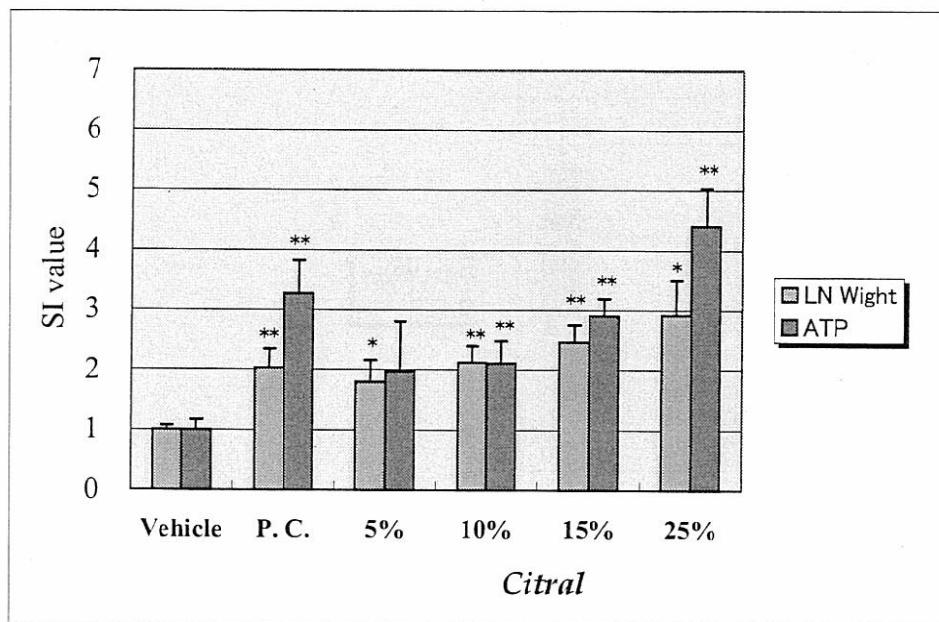


図6-10 DA-LLNA試験におけるCitralのリンパ節重量およびATP量の増加率。
 値は平均±S. D.、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。Vehicle;AOO溶媒、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。

表6-11 LLNA-DA試験結果 (Imidazolidinyl urea) Vehicle; DMF、P. C. 1; Eugenol 10%/DMF、AOO; acetone/olive oil (4:1, v/v)、P. C. 2; Eugenol 10%/AOO。 p 値はt検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

AOO群はSI値を1とし、P. C. 2はAOO群に対するSI値および p 値を示した。

投与開始時動物週齢: 10W

投与開始日: 2003年9月3日

摘出・測定日: 2003年9月10日

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p 値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p 値
Vehicle	23.9	4.28	4.03	0.55	1.00	-	4424	3428	905	1.00	-
	24.4	3.98					3087				
	26.6	3.29					2348				
	26.0	4.56					3854				
P. C. 1	23.5	4.72	5.07	1.15	1.26	$p < 0.05$	5738	5813	1842	1.70	
	24.0	5.23					5644				
	26.9	3.77					3688				
	26.2	6.54					8185				
Imidazolidinyl urea 10%	24.0	5.72	5.65	0.85	1.40	$p < 0.05$	7333	8084	1805	2.36	$p < 0.01$
	27.0	4.76					6777				
	26.9	6.46					10143				
Imidazolidinyl urea 25%	27.6	7.17	7.41	0.22	1.84	$p < 0.01$	9854	11848	2027	3.46	$p < 0.01$
	28.0	7.60					13907				
	28.2	7.47					11783				
Imidazolidinyl urea 50%	26.3	9.00	9.43	0.85	2.34	$p < 0.01$	14760	16010	1720	4.67	$p < 0.01$
	23.2	8.88					15299				
	23.1	10.41					17971				
AOO	24.5	3.01	3.39	0.39	1.00	-	2660	2580	518	1.00	-
	25.6	3.71					2856				
	24.0	3.09					1828				
	25.6	3.74					2975				
P. C. 2	21.9	10.80	9.29	1.20	2.74	$p < 0.01$	19298	15859	3223	6.15	$p < 0.01$
	22.1	9.44					17360				
	22.3	9.04					14953				
	23.6	7.89					11827				

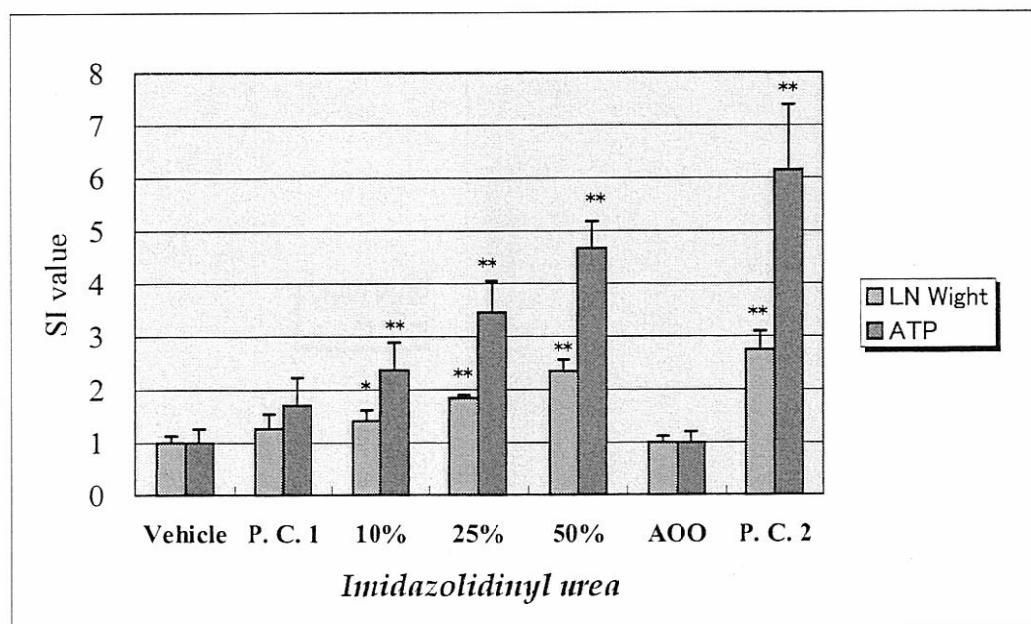


図6-11 DA-LLNA試験におけるImidazolidinyl ureaのリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。Vehicle; DMF、P. C. 1; Eugenol 10%/DMF、AOO; acetone/olive oil (4:1, v/v)、P. C. 2; Eugenol 10%/AOO。AOO群はSI=1とし、P. C. 2はAOO群に対するSI値および有意差を示した。

表6-12 LLNA-DA試験結果 (2-Mercaptobenzothiazol、MBT) Vehicle; DMF、P. C. 1; Eugenol 10%/DMF、

AOO; acetone/olive oil (4:1, v/v)、P. C. 2; Eugenol 10%/AOO。

p 値はt検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。AOO群はSI値を1とし、P. C. 2はAOO群に対するSI値および p 値を示した。

投与開始時動物週齢: 10W

投与開始日: 2003年9月3日

摘出・測定日: 2003年9月10日

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p 値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p 値
Vehicle	23.9	4.28	4.03	0.55	1.00	-	4424	3428	905	1.00	-
	24.4	3.98					3087				
	26.6	3.29					2348				
	26.0	4.56					3854				
P. C. 1	23.5	4.72	5.07	1.15	1.26		5738	5813	1842	1.70	
	24.0	5.23					5644				
	26.9	3.77					3688				
	26.2	6.54					8185				
MBT 10%	25.2	4.77	4.86	0.12	1.21		7829	6859	1111	2.00	$p < 0.01$
	23.9	4.81					7102				
	26.3	4.99					5647				
MBT 25%	26.0	5.60	4.66	0.91	1.16		6978	4601	2283	1.34	
	24.2	3.79					2425				
	23.9	4.60					4401				
MBT 50%	23.6	4.73	4.69	0.06	1.17		3976	3675	889	1.07	
	24.2	4.72					4375				
	23.2	4.63					2675				
AOO	24.5	3.01	3.39	0.39	1.00	-	2660	2580	518	1.00	-
	25.6	3.71					2856				
	24.0	3.09					1828				
	25.6	3.74					2975				
P. C. 2	21.9	10.80	9.29	1.20	2.74	$p < 0.01$	19298	15859	3223	6.15	$p < 0.01$
	22.1	9.44					17360				
	22.3	9.04					14953				
	23.6	7.89					11827				

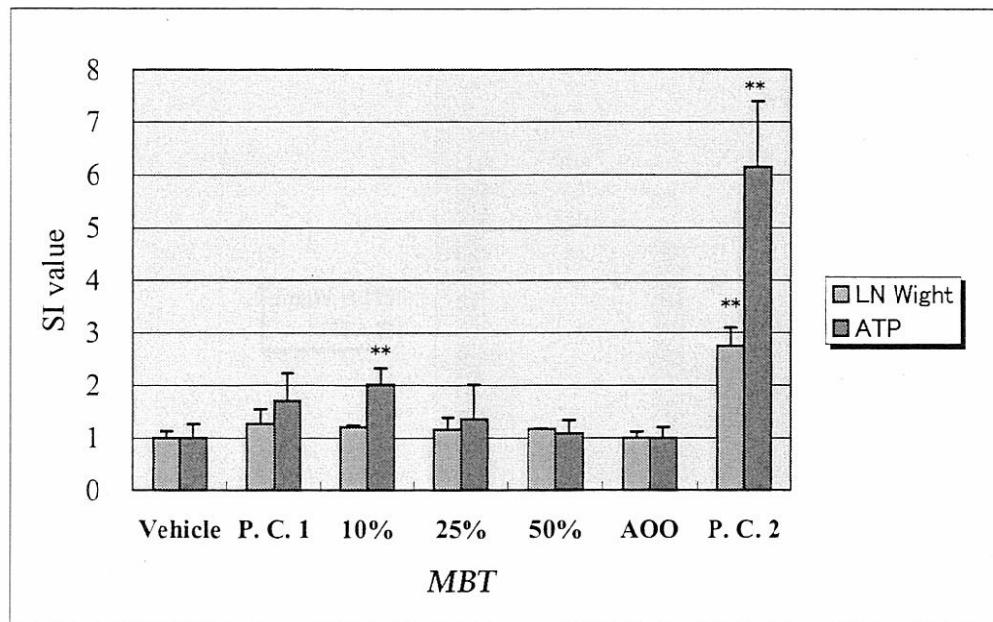


図6-12 DA-LLNA試験における2-Mercaptobenzothiazol(MBT)のリンパ節重量およびATP量の増加率。

値は平均±S. D., * $p < 0.05$ 、 ** $p < 0.01$ 。Vehicle; DMF、P. C. 1; Eugenol 10%/DMF、AOO; acetone/olive oil (4:1, v/v)、P. C. 2; Eugenol 10%/AOO。AOO群はSI=1とし、P. C. 2はAOO群に対するSI値および有意差を示した。

表6-13 LLNA-DA試験結果 (CoCl_2) Vehicle; DMSO、P. C. 1; Eugenol 10%/DMSO、AOO; acetone/olive oil (4:1, v/v)、P. C. 2; Eugenol 10%/AOO。 p 値は t 検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。AOO群はSI値を1とし、P. C. 2はAOO群に対するSI値および p 値を示した。

投与開始時動物週齢: 10W

投与開始日: 2003年8月27日

摘出・測定日: 2003年9月3日

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p 値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p 値
Vehicle	20.9	4.38	5.98	1.11	1.00	-	4770	6674	1527	1.00	-
	23.9	6.09					6914				
	27.4	6.60					8487				
	23.3	6.84					6527				
P. C. 1	24.4	9.00	9.35	1.57	1.56	$p < 0.05$	10887	12399	2877	1.86	$p < 0.05$
	24.6	11.24					16484				
	21.9	7.46					9982				
	25.3	9.68					12245				
CoCl_2 1%	25.2	10.64	10.11	0.47	1.69	$p < 0.01$	17709	14270	2981	2.14	$p < 0.01$
	26.0	9.90					12673				
	26.1	9.78					12428				
CoCl_2 2.5%	23.7	11.07	11.99	0.81	2.01	$p < 0.01$	17680	18117	606	2.71	$p < 0.01$
	23.9	12.30					17863				
	23.5	12.59					18809				
CoCl_2 5%	26.1	16.58	15.61	3.18	2.61	$p < 0.01$	28248	24298	6013	3.64	$p < 0.01$
	24.6	18.19					27268				
	23.9	12.06					17378				
AOO	22.7	3.80	3.83	0.17	1.00	-	3529	3014	436	1.00	-
	24.3	4.04					3106				
	21.7	3.85					2949				
	24.4	3.63					2473				
P. C. 2	25.3	11.21	9.59	1.35	2.50	$p < 0.01$	20105	15535	3114	5.15	$p < 0.01$
	25.7	8.46					14663				
	24.6	10.18					14233				
	25.3	8.50					13137				

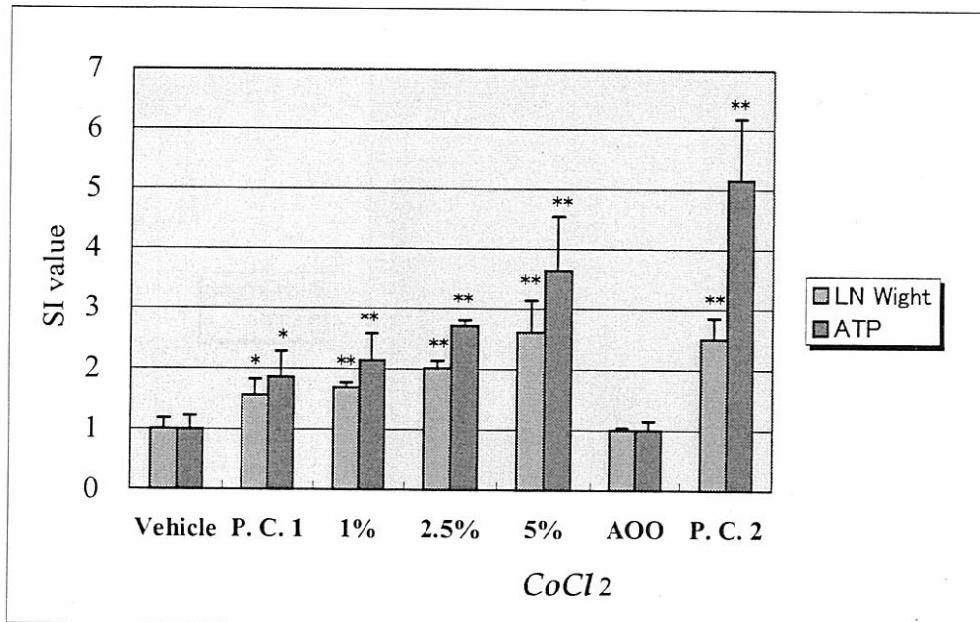


図6-13 DA-LLNA試験における CoCl_2 のリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。Vehicle; DMSO、P. C. 1; Eugenol 10%/DMSO、AOO; acetone/olive oil (4:1, v/v)、P. C. 2; Eugenol 10%/AOO。AOO群はSI=1とし、P. C. 2はAOO群に対するSI値および有意差を示した。

表6-14 LLNA-DA試験結果 (NiSO_4) Vehicle;DMSO、P. C. 1;Eugenol 10%/DMSO、AOO;acetone/olive oil (4:1, v/v)、P. C. 2;Eugenol 10%/AOO。 p 値はt検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。AOO群はSI値を1とし、P. C. 2はAOO群に対するSI値および p 値を示した。

投与開始時動物週齢: 10W

投与開始日: 2003年8月27日

摘出・測定日: 2003年9月3日

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p 値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p 値
Vehicle	20.9	4.38	5.98	1.11	1.00	-	4770	6674	1527	1.00	-
	23.9	6.09					6914				
	27.4	6.60					8487				
	23.3	6.84					6527				
P. C. 1	24.4	9.00	9.35	1.57	1.56	$p < 0.05$	10887	12399	2877	1.86	$p < 0.05$
	24.6	11.24					16484				
	21.9	7.46					9982				
	25.3	9.68					12245				
NiSO_4 1%	23.6	6.28	6.71	1.37	1.12		7672	9098	1743	1.36	
	25.3	8.24					11041				
	24.5	5.61					8581				
NiSO_4 2.5%	24.6	7.97	7.75	0.38	1.30	$p < 0.05$	10829	14496	6269	2.17	
	22.0	7.32					10925				
	20.3	7.97					21735				
NiSO_4 5%	22.0	7.45	8.68	1.26	1.45	$p < 0.05$	15969	12346	3326	1.85	$p < 0.05$
	24.0	8.62					9433				
	23.6	9.97					11636				
AOO	22.7	3.80	3.83	0.17	1.00	-	3529	3014	436	1.00	-
	24.3	4.04					3106				
	21.7	3.85					2949				
	24.4	3.63					2473				
P. C. 2	25.3	11.21	9.59	1.35	2.50	$p < 0.01$	20105	15535	3114	5.15	$p < 0.01$
	25.7	8.46					14663				
	24.6	10.18					14233				
	25.3	8.50					13137				

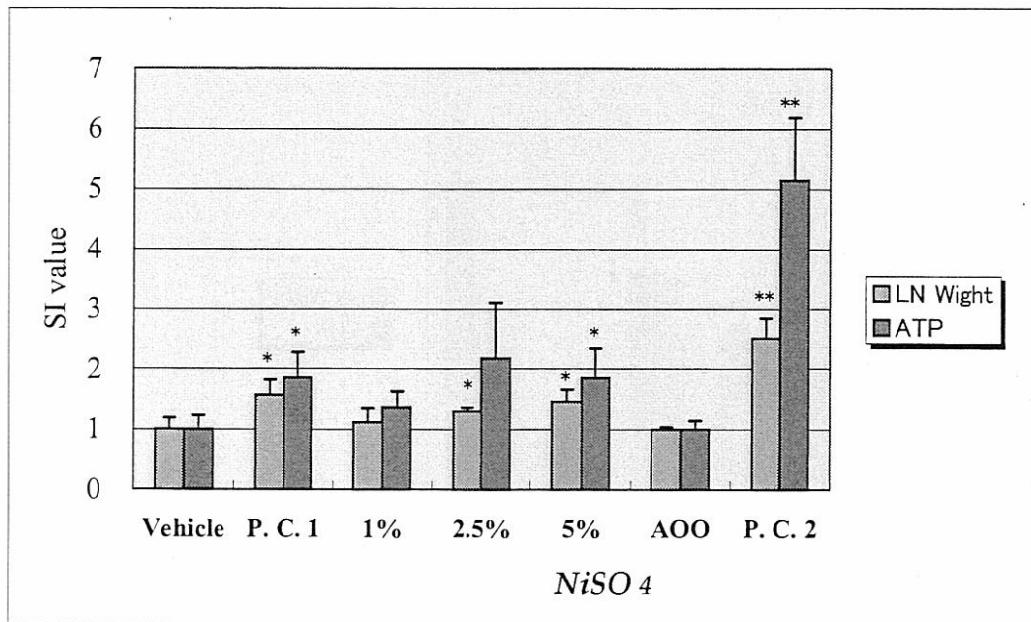


図6-14 DA-LLNA試験における NiSO_4 のリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S.D.、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。Vehicle;DMSO、P. C. 1;Eugenol 10%/DMSO、AOO;acetone/olive oil (4:1, v/v)、P. C. 2;Eugenol 10%/AOO。AOO群はSI=1とし、P. C. 2はAOO群に対するSI値および有意差を示した。

表6-15 LLNA-DA試験結果 (Propylparaben) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。
 p 値はt検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 9W

投与開始日: 2003年7月30日

摘出・測定日: 2003年8月6日

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p 値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p 値
Vehicle	24.8	4.51	4.37	0.23	1.00	-	3759	3871	344	1.00	-
	20.8	4.63					3995				
	21.3	4.18					3461				
	22.5	4.17					4269				
P. C.	22.3	9.07	10.19	1.56	2.33	$p < 0.01$	16624	18535	3636	4.79	$p < 0.01$
	25.2	12.35					23785				
	26.4	9.01					15667				
	21.3	10.31					18066				
Propylparaben 5%	22.0	4.30	4.25	0.46	0.97		5058	4288	1095	1.11	
	22.5	4.69					4773				
	22.1	3.77					3034				
Propylparaben 10%	25.2	5.37	4.51	0.76	1.03		5539	4390	1000	1.13	
	23.8	3.93					3919				
	23.3	4.22					3713				
Propylparaben 25%	25.7	4.66	4.19	0.61	0.96		6385	4959	1995	1.28	
	21.8	4.42					5813				
	21.5	3.50					2679				

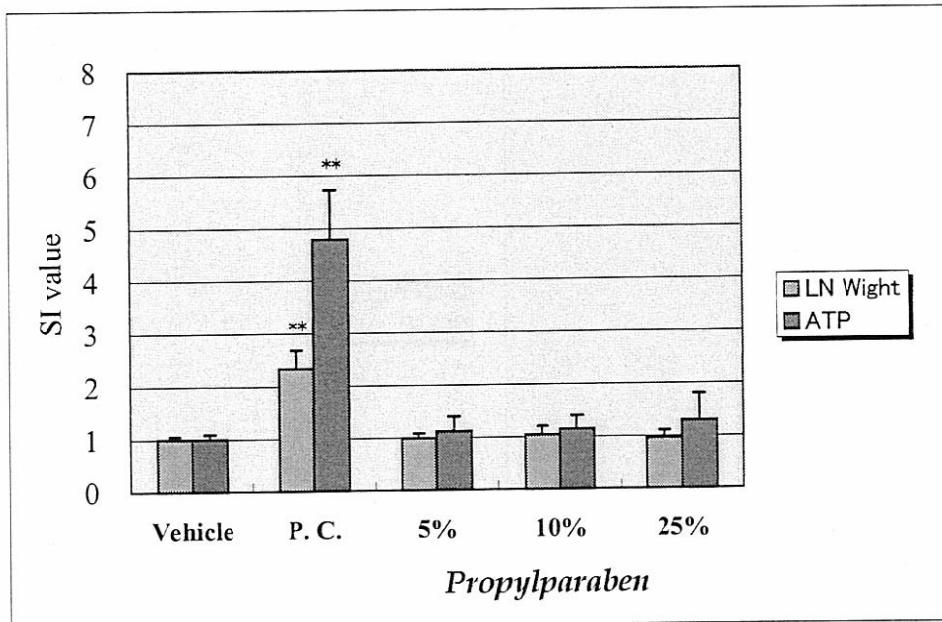


図6-15 DA-LLNA試験におけるPropylparabenのリンパ節重量およびATP量の増加率。
 $\text{値は平均} \pm \text{S. D.}, * p < 0.05, ** p < 0.01$ 。Vehicle;AOO、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。

表6-16 LLNA-DA試験結果 (Methyl salicylate) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。

p 値は t 検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 9W

投与開始日: 2003年7月30日

摘出・測定日: 2003年8月6日

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p 値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p 値
Vehicle	24.8	4.51	4.37	0.23	1.00	-	3759	3871	344	1.00	-
	20.8	4.63					3995				
	21.3	4.18					3461				
	22.5	4.17					4269				
P. C.	22.3	9.07	10.19	1.56	2.33	$p < 0.01$	16624	18535	3636	4.79	$p < 0.01$
	25.2	12.35					23785				
	26.4	9.01					15667				
	21.3	10.31					18066				
Methyl salicylate 5%	21.2	4.57	4.20	0.49	0.96		3250	2773	878	0.72	
	23.0	4.38					3310				
	20.1	3.64					1760				
Methyl salicylate 10%	24.1	4.89	4.92	0.49	1.13		4499	3723	1464	0.96	
	22.8	5.43					4637				
	23.0	4.45					2035				
Methyl salicylate 25%	25.9	4.56	5.14	0.57	1.18		4542	4661	732	1.20	
	24.6	5.69					5445				
	23.1	5.17					3996				

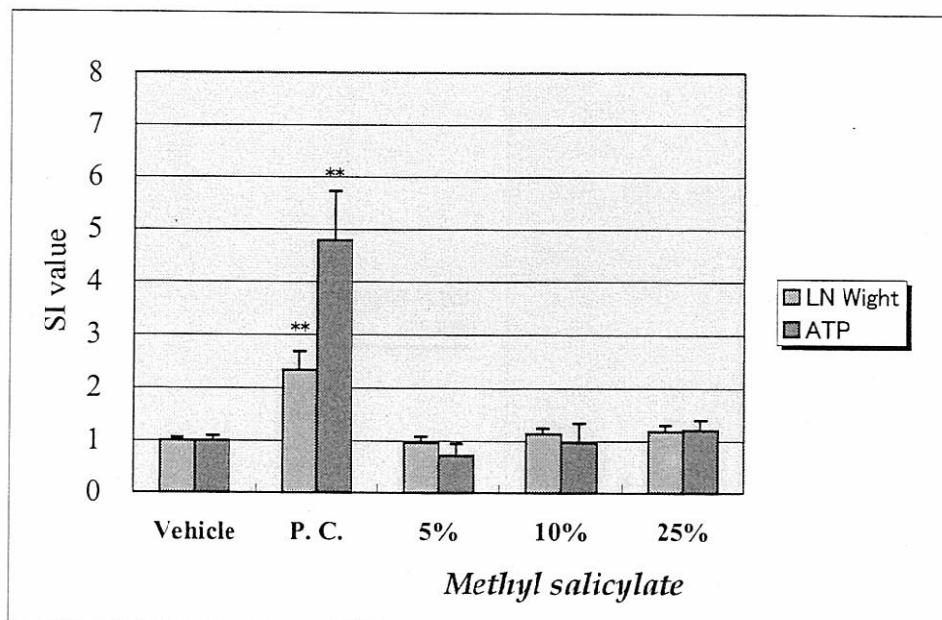


図6-16 DA-LLNA試験におけるMethyl salicylateのリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。Vehicle;AOO、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。

表6-17 LLNA-DA試験結果 (Benzalkonium chloride、BzC) Vehicle; AOO溶媒(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ; Eugenol 10%/AOO。Vehicle群の1匹が麻酔操作のミスにより死亡し $n=2$ となつたため、有意差検定は行わなかつた。

投与開始時動物週齢: 10W

投与開始日: 2003年8月20日

摘出・測定日: 2003年8月27日

	体重 (g)	リンパ節重量 (mg)	平均 (mg)	標準偏差 (mg)	SI値	p 値	ATP発光量 (RLU)	平均 (RLU)	標準偏差 (RLU)	SI値	p 値
Vehicle	26.2	4.24	4.01	0.33	1.00	-	6677	4677	2827	1.00	-
	26.2	3.77					2678				
	死亡	-					-				
P. C.	23.4	10.55	8.98	1.51	2.24	N. D.	17961	17452	2698	3.73	N. D.
	22.0	8.84					19860				
	24.8	7.54					14536				
BzC 1%	25.4	8.83	8.20	1.59	2.05	N. D.	20827	22429	7040	4.80	N. D.
	24.9	9.38					30132				
	23.2	6.40					16329				
BzC 2.5%	25.0	9.41	10.42	0.90	2.60	N. D.	21150	18058	3869	3.86	N. D.
	25.2	10.73					19305				
	24.6	11.12					13719				
BzC 5%	24.4	9.11	8.95	0.22	2.23	N. D.	8840	8942	1126	1.91	N. D.
	20.6	9.04					10115				
	24.1	8.70					7871				

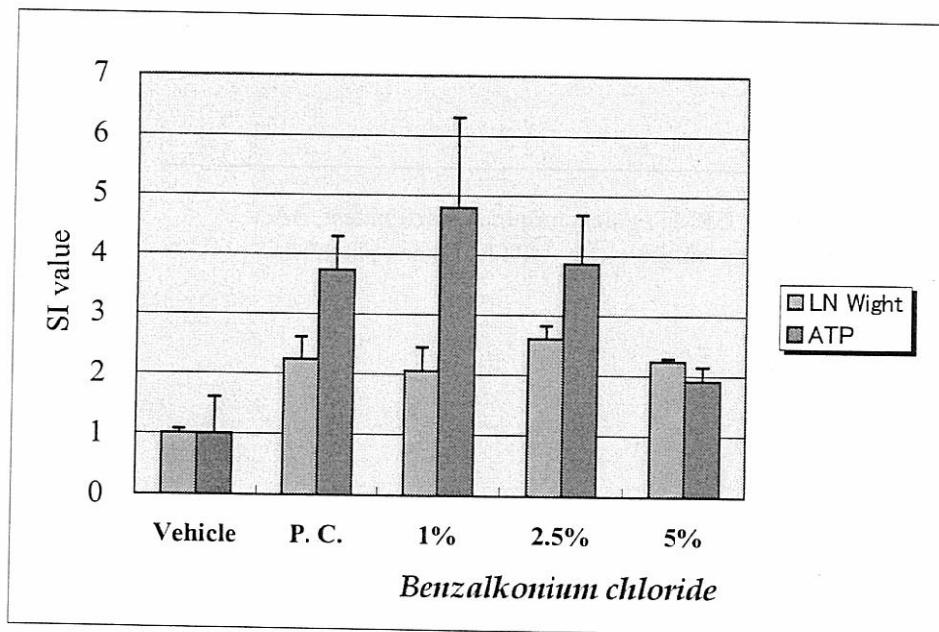


図6-17 DA-LLNA試験におけるBenzalkonium chlorideのリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.。Vehicle; AOO溶媒、P. C. ; Eugenol 10%/AOO。

表6-18 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

Chemical name	LLNA-DA	LLNA	GPMT/BA	HMT	HPTA
DNCB	+	+	+		
pPDA	+	+	+	+	+
Trimelitic anhydride	+	+	+		
Cinnamic aldehyde	+	+	+	+	+
Isoeugenol	+	+	+		+
Eugenol	+	+	+		+
Benzocaine	+	+/-	+	+/-	
Abietic acid	+	+	+		+
HCA	+	+	+		
Citral	+	+	+	+	
Imidazolidinyl urea	+	+	+		+
MBT	-	+	+	+	+
CoCl ₂	+	+	+	+	+
NiSO ₄	-	-	+	+	+
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.

表6-19 EC₃のまとめ LLNA-DAのATP発光量を指標としたSI値より求めたEC₃はLLNAのEC₃(文献値)とほぼ一致する。

Chemicals	Vehicle	EC ₃ value (LLNA-DA)	EC ₃ value (LLNA)	GPMT ⁶⁾
2,4-Dinitrochlorobenzene	AOO	0.05%	0.03~0.09% 1) 2) 5)	Extreme
<i>p</i> -Phenylenediamine	AOO	0.35%	0.06~0.20% 1) 3)	Extreme
Trimellitic anhydride	AOO	0.20%	<2.5% 6)	Moderate
Cinnamic aldehyde	AOO	2.98%	1.7% ⁴⁾ 、2.0% ¹⁾	Extreme
Isoeugenol	AOO	2.46%、2.28%、3.40%	1.3~3.3% 1) 5)	Extreme
Eugenol	AOO	4.23%、5.09%、5.59%	5.8~14.5% 1) 5)	Moderate
Benzocaine	AOO	6.57%	negative ^{6) 7)} 、+/- ²⁾	Moderate
Abietic acid	AOO	7.90%	3.13% ⁶⁾	Moderate
Hexyl cinnamic aldehyde	AOO	11.6%	4.0~11.9% 1) 2) 5)	Moderate ⁹⁾
Citral	AOO	15.6%	13% ¹⁾	Moderate
Imidazolidinyl urea	DMF	18.8%	23.9% ⁶⁾	Strong
2-Mercaptobenzothiazol	DMF	negative	<10 ⁶⁾	Strong
CoCl ₂	DMSO	3.27%	0.82% ⁸⁾	Extreme
NiSO ₄	DMSO	negative	negative ^{2) 8)}	Moderate
Propyl paraben	AOO	negative	>50% ¹⁾ 、negative ²⁾	Non-sensitizer
Methyl salicylate	AOO	negative	negative ^{2) 6)}	Non-sensitizer

表6-19の引用文献

- 1) Baskettter, et al., *Contact Dermatitis* (2000) **42**, 344-348.
- 2) Haneke, et al., *Reg. Toxicol. Pharmacol.* (2001) **34**, 274-286.
- 3) Warbrick, et al., *J. Appl. Toxicol.* (1999) **19**, 255-260.
- 4) Wright , et al., *Int. J. Cosmet. Sci.* (2001) **23**, 75-83.
- 5) Loveless, et al., *Toxicol.* (1996) **108**, 141-152.
- 6) Baskettter, et al., *Fd. Chem. Toxicol.* (1992) **30**, 65-69.
- 7) Suda, et al., *J. Toxicol. Sci.* (2002) **27**, 205-218.
- 8) Ikarashi, et al., *Toxicol.* (1992) **76**, 283-292.
- 9) Cronin, et al., *SAR QSAR Environ. Res.* (1994) **2**, 159-179.

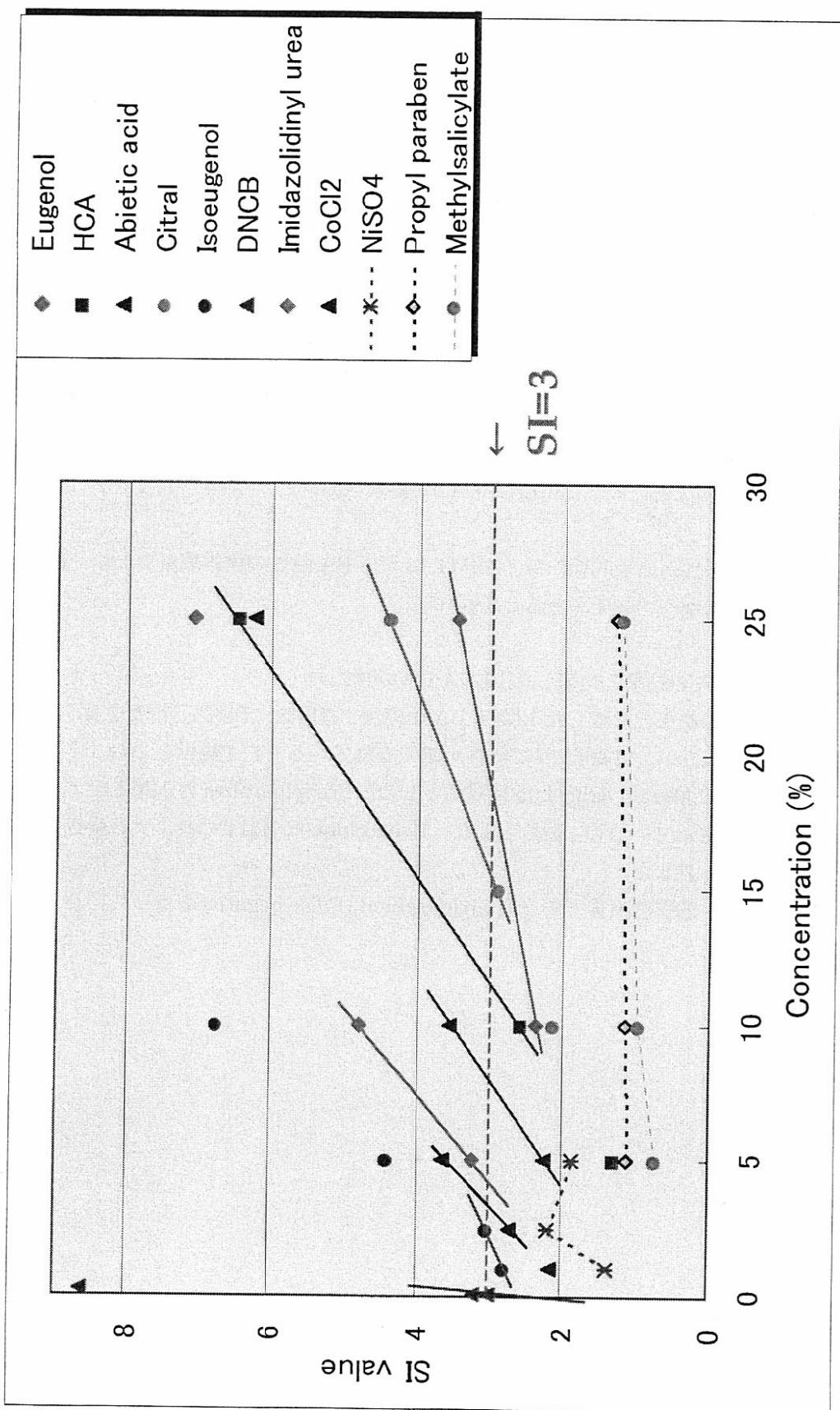


図6-18 SI値-用量プロット 主な被験物質のATP発光量を指標としたSI値を用量に対してプロットした。外挿した直線とSI=3の交点がEC₃を表す。

資料7) LLNA-DAの感度、特異性、予測性、精度

—試験法の感度、特異性、予測性、精度（一致率）を記載した資料

7-1 LLNAの結果と比較した LLNA-DA の検出力

LLNAの結果と比較した LLNA-DA の感度 (Sensitivity)、特異性 (Specificity)、予測性 (Positive Predictivity、Negative Predictivity)、精度 (Accuracy) を表7-1に纏めた。BenzocaineのLLNAの評価結果は一貫性が無く土とされているため、対象から外した。

いずれも75%以上の値となっている。特異性および陰性予測性については、今後 LLNA 陰性の検体数を増やす必要があると思われる。

7-2 GPMT および BA の結果と比較した LLNA-DA の検出力

GPMT および BA の結果と比較した LLNA-DA の感度、特異性、予測性、精度を表7-2に纏めた。

特異性および陰性予測性が比較的低いが、GPMT および BA 陰性の検体数が少なく、正確な評価のためには今後増やす必要があると思われる。

7-3 HMT および HPTA の結果と比較した LLNA-DA の検出力

HMT および HPTA の結果と比較した LLNA-DA の感度、特異性、予測性、精度を表7-3に纏めた。ヒトのデータについては何れかで陽性が報告されているものを陽性とした。HMT で陰性が報告されている Methyl salicylate は陰性とした。Propylparaben は HMT で土であるが、HPTA で+とされているので陽性とした。Benzocaine は HMTのみで土と報告されているため、対象から外した。

金属塩のNiSO₄、弱い感作性物質であるPropylparabenはFalse negativeとなっている。

表7-1 LLNA-DAの検出力(対LLNA)

		LLNA									
		Positive	Negative								
LLNA-DA	Positive	11chemicals	Benzalkonium chloride 1chemicals								
	DNCB pPDA Cinnamaldehyde Isoeugenol Eugenol Abietic acid HCA Citral Imidazolidinyl urea CoCl ₂ Trimellitic anhydride										
Negative	MBT	1chemicals	NiSO ₄ Propyl paraben Methyl salicylate 3chemicals								
Comparison	No. of comparisons	Sensitivity	Specificity	Positive Predictivity	Negative Predictivity	Accuracy					
LLNA-DA vs LLNA	16	(11 / 12)	75%	(11 / 12)	92%	(3 / 4)	75%	(3 / 4)	92%	(14 / 16)	88%

表7-2 LLNA-DAの検出力(対GPMT/BA)

LLNA-DA	Positive	GPMT/BA	
		Positive	Negative
	DNCB pPDA Cinnamaldehyde Isoeugenol Eugenol Abietic acid HCA Citral Imidazolidinyl urea CoCl_2 Benzocaine Trimellitic anhydride	12 chemicals	Benzalkonium chloride
	MBT NiSO_4	2 chemicals	Propyl paraben Methyl salicylate
	Negative		

Comparison	No. of comparisons	Sensitivity	Specificity	Positive Predictivity	Negative Predictivity	Accuracy
LLNA-DA vs GPMT/BA	17	86% (12 / 14)	67% (2 / 3)	92% (12 / 13)	50% (2 / 4)	82% (14 / 17)

GPMT: guinea pig maximization test

BA: Buehler assay

表7-3 LLNA-DAの検出力(対HMT/HPTA)

		HMT/HPTA	
		Positive	Negative
LLNA-DA	Positive	9chemicals	0chemicals
	Negative	3chemicals	1chemicals

pPDA
Cinnamaldehyde
Isoeugenol
Eugenol
Abietic acid
Benzalkonium chloride
Citral
Imidazolidinyl urea
 CoCl_2

MBT
 NiSO_4
Propyl paraben

Comparison	No. of comparisons	Sensitivity	Specificity	Positive Predictivity	Negative Predictivity	Accuracy
LLNA-DA vs HMT/HPTA	13	75% (9 / 12)	100% (1 / 1)	100% (9 / 9)	25% (1 / 4)	77% (10 / 13)

HMT:human maximization test

HPTA:human patch test allergen

資料8) LLNA-DAの特徴

—試験法の特徴（適用範囲、false positive, false negative）

8-1 LLNA-DAの適用範囲、False positive、False negative

LLNA-DAはLLNAのエンドポイントの変更であるから、その適用範囲は原則的にLLNAと同等と考えられる。

即ち、LLNA-DAで使用可能なVehicleを用いた溶液または懸濁液として、マウス耳介に投与可能あらゆる物質が評価可能である。guinea pigを用いる方法は感作誘発期の皮膚反応を評価するため、着色したサンプルのなかには評価が困難なものもあるが、LLNA-DAには適用可能である。

LLNAで検出できない弱い感作性物質および一部の金属は、リンパ球増殖活性が充分でない事を意味しているため、LLNA-DAでも同様にFalse negativeとなると予想される。同様に、LLNAで陽性となる幾つかの強い刺激性物質は、LLNA-DAでもFalse positiveとなると予想される。

LLNAと比較した場合、SI=3を示す濃度(EC₃)がよく一致する事から、検出感度はほぼ同等と予想される。ただし、判定が微妙な被験物質の中には、結果が異なるという事も起こり得る。

今回の17検体の評価結果では、LLNAに対してはMBTがFalse negative、Benzalkonium chlorideがFalse positiveであった。GPMT/BAに対しては、MBTおよびNiSO₄がFalse negative、Benzalkonium chlorideがFalse positiveであった。HMT/HPTAに対しては、MBTおよびNiSO₄、Propyl parabenがFalse negative、False positiveは無かった。

8-2 SI値の再現性

陽性対照物質として用いている10%Eugenol/AOOのSI値のヒストリカルデータを図8-1に示した。リンパ節重量、ATP発光量ともに、SI値は一定レベルの値を示しており、再現性がある。

8-3 EC₃の再現性

3回の独立した試験を行ったEugenolおよびIsoeugenolの評価結果を表8-1-1および表8-1-2に纏めた。SI値を指標としたEC₃にはそれぞれ再現性が認められる。

8-4 4回目の投与日の比較

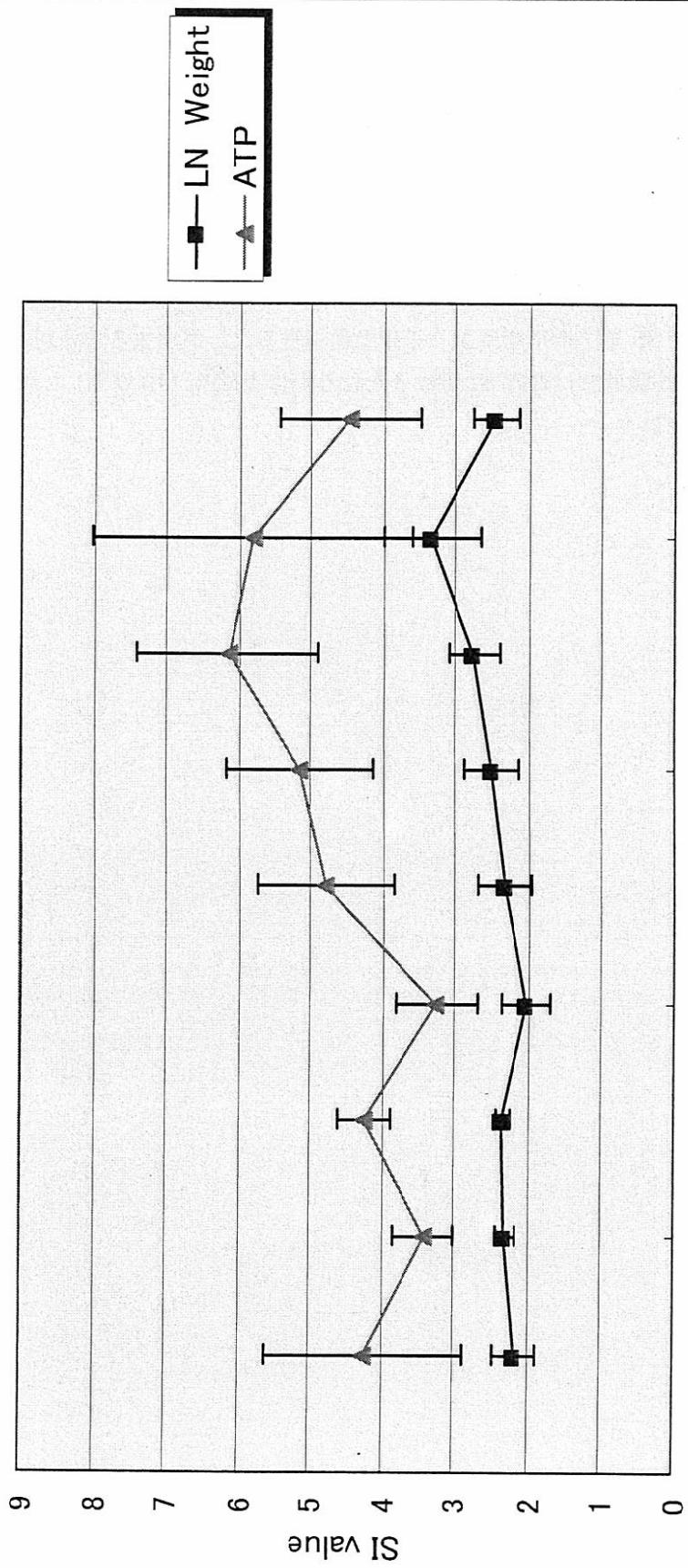
EugenolのExp. 2は、比較のためにDay6に4回目の投与を行っている。Exp. 1、Exp. 3と比較して、SI値はいずれも最も低い値であり、EC₃は最も高い値となった。しかしその差はばらつきの範囲内と考えられる。

Day6に4回目の投与を行ってもほぼ同等の結果が得られると予想されるものの、Day7

の方がより望ましい（実績数が多いため）。

8-5 高用量域での ATP 測定値のばらつき

Isoeugenol Exp. 1 では、25%および50%投与群で、ATP 測定値のばらつきが見られた。この例に限らず、リンパ節重量が 20mg を超えるような場合は、組織の懸濁に用いる PBS の量が 500 μ L であるため懸濁液が均一とならず ATP 測定値がばらつく危険性がある。組織の懸濁に用いる PBS 量を増やせばより正確な値を得ることが出来ると予想される。しかしながらこのような用量域では通常 SI 値は 3 をはるかに上回る（10 以上）ため、試験の判定の上では重要ではない。



Data presented as mean \pm S. D.

図8-1 SI値の再現性 10%Eugenol/AOOについて、独立した9回の試験におけるLNノーパ節重量(LN Weight)とATPのSI値を、AOO群を1として示した。

表8-1-1 IsoeugenolのEC₃の再現性 Isoeugenolについて、独立した3回のLLNA-DAによる結果を纏めた。EC₃(はATP発光量を指標として求めた)。

Concentration(%)	SI value (ATP) ± S.D.		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Vehicle (AOO)	1.00 ± 0.54	1.00 ± 0.54	1.00 ± 0.30
0.5	1.50 ± 0.54		1.22 ± 0.13
1	2.28 ± 0.60		2.77 ± 1.01
2.5	2.78 ± 0.17	3.11 ± 1.15	3.01 ± 0.98
5	3.39 ± 0.69	4.39 ± 1.25	
10	5.68 ± 1.19	6.77 ± 0.23	
EC₃	3.40%	2.28%	2.46%

表8-1-2 EugenolのEC₃の再現性 Eugenolについて、独立した3回のLLNA-DAによる結果を纏めた。EC₃(はATP発光量を指標として求めた)。

Concentration(%)	SI value (ATP) ± S.D.		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Vehicle (AOO)	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.09
5	2.92 ± 1.00	2.80 ± 1.08	3.24 ± 0.70
10	7.35 ± 2.62	4.47 ± 0.98	4.79 ± 0.94
25	10.92 ± 3.63	5.62 ± 3.20	7.07 ± 0.44
EC₃	5.09%	5.59%	4.23%