

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（2010 年）5 月 17 日
平成 23 年（2011 年）4 月 20 日改定

JaCVAM 評価会議

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）
田中憲穂（食品薬品安全センター 秦野研究所）
吉田武美（昭和大学薬学部）
横関博雄（東京医科歯科大学）
吉村 功（東京理科大学）
渡部一人（日本製薬工業協会）
岡本裕子（日本化粧品工業連合会）
大島健幸（日本化学工業協会）
小野寺博志（医薬品医療機器総合機構）
小笠原弘道（医薬品医療機器総合機構）
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 病理部）
五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部）
長谷川隆一（独立行政法人 製品評価技術基盤機構）
浅野哲秀（元日東電工株式会社）

任期：平成 22 年 4 月 1 日～平成 24 年 3 月 31 日

オブザーバー：JaCVAM 運営委員

大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所）
関野祐子（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部）
増田光輝（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部）
小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部）
秋田正治（日本動物実験代替法学会）
柴辻正喜（厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室）
実国慎一（経済産業省 製造産業局 化学物質安全対策室）

任期：平成 22 年 4 月 1 日～平成 23 年 4 月 30 日

皮膚感作性試験である LLNA (Local Lymph Node Assay) : BrdU 法について、第三者評価委員会からの報告を受け¹⁾、以下の 8 項目について審議した。7 項目までは OECD ガイダンス文書 No. 34 に示された検討項目である²⁾。なお、本動物実験代替法の利用にあたっては、適用範囲を十分に配慮した上で使用されるべきである。

< 審議内容 >

1. 検討対象の試験法とその妥当性を示すデータは、透明で独立な評価を受けているか。
 - ・ 提案施設での性能研究の結果はすでに学術論文として公表されている。施設間バリデーション研究の結果は、学術雑誌に公開されている³⁾。
 - ・ その内容は、独立した専門家からなる「日本動物実験代替法学会評価委員会（大野泰雄委員長）」によって評価され、その結果が「(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) の一次および二次評価報告書¹⁾」にまとめられている。
 - ・ バリデーションの過程でプロトコルに若干の変更が行われた。
2. 当該試験法で得られるデータは、対象毒性を十分に評価あるいは予測できるものであるか。データは、当該試験法と従来の試験法の、代替法としての繋がりを示しているか。あるいは (同時に) そのデータは、当該試験法と、対象としているあるいはモデルとしている動物種についての影響との繋がりを示しているか。
 - ・ 当該試験法は、免疫毒性の皮膚感作性の試験法として認められている LLNA⁴⁾ の代替法と位置づけられる試験法である。
 - ・ 従来の試験法 (Maximization 法 : GPMT、LLNA 原法) との比較も十分になされており、代替法としての評価手順に問題はないと思われる
 - ・ 当該試験法は、放射性同位元素 (RI) ³H methyl-thymidine 標識法を使わず、BrdU 標識法を使うこと以外は、LLNA 原法と同じである。
 - ・ LLNA 原法を規準とした場合、評価されている対象毒性について、感度、特異度が概ね 80%以上と高い値になっている。 LLNA 原法と同等程度の評価が可能である。
 - ・ 多施設バリデーションの結果、施設内及び施設間再現性は、LLNA 原法とほぼ同等である。
3. 当該試験法は、ハザードあるいはリスク、あるいはその両方を評価するのに有用であるか。
 - ・ LLNA 原法と同じくハザード同定に利用できると考えられるが、リスク評価には使用できない。
4. 当該試験法とその妥当性を示すデータは、その試験法で安全性を保証しようとする、行政上のプログラムあるいは関係官庁が対象としている化学物質や製品を、十分広く対象としたものとなっているか。当該試験法が適用できる条件及び適用できない条件が明確であるか。
 - ・ 可溶性物質を対象としており、固体あるいは溶解性の低い物質には適用できない。
 - ・ 刺激性物質と感作性物質の判断が難しいという適用限界もある。
適用限界は LLNA 原法と同様である。

5. 当該試験法は、プロトコルの微細な変更に対して十分頑健で、適切な訓練経験を持つ担当者と適切な設備のある施設において、技術習得が容易なものであるか。
- ・ ^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は、細胞を特に処理することなく RI 活性を測定すればよいが、LLNA : BrdU 法では細胞の事前処理が必要であり、試験結果のばらつきや施設間差を生じる要因は、LLNA 原法と比較して多くなる。当該試験法で妥当な被験物質評価が得られるためには、試験プロトコルが忠実に守られることが必要である。
 - ・ 良い性能が得られるためには、LLNA 原法と比較してやや高度な技術習得が必要である。
6. 当該試験法は、時間的経費的に有用性があり、行政上で用いられやすいものであるか。
- ・ RI を使用しない当該試験法は、LLNA 原法と比べて、法規制上、施設上の負担が軽減されるという利点がある。
 - ・ 操作時間は LLNA 原法と同等である。
 - ・ 経費が LLNA 原法より軽減されている。
- 従って、行政試験法として使用されやすいものである。
7. 当該試験法は、従来の試験法と比べて、科学的・倫理的・経済的に、新しい試験法あるいは改訂試験法であることが正当化されているか。
- ・ 科学的には、リンパ球の増殖をみているという点で、LLNA 原法と同じメカニズムである。
 - ・ LLNA 原法と比較して、倫理的な面での差は小さい。
 - ・ 実施施設・試験実施者に制限がなく、廃棄物処理の負担が軽減され、経済的な利点がある。
- LLNA 原法の改訂試験法として正当化できる。

8. 安全性評価のための行政的資料として、受け入れ可能な試験法であるか。

本試験法は、皮膚感作性評価を目的とし、既存の LLNA 原法と同程度の検出力を持つ。医薬品、医薬部外品、化粧品成分及び化学物質の皮膚感作性評価に有用である。

以上の審議の結果、JaCVAM 評価会議は、皮膚感作性試験である LLNA : BrdU 法を定められた方法で注意点を適切に守って利用すれば、化学物質の感作性を科学的に評価できると結論した。

参考文献

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) の一次及び二次評価報告書
2. OECD (2005) OECD Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, ENJ/JM/MONO(2005) 14
3. Kojima H, Takeyoshi M, Sozu T, Awogi T, Arima K, Idehara K, Ikarashi Y, Kanazawa Y, Maki E, Omori T, Yuasa A, Yoshimura I.: Inter-laboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation. J Appl Toxicol. 31(1)63-74 (2010)
4. OECD(2004) OECD guideline for the testing of chemicals, Test guideline: 429, Local Lymph

Node Assay (LLNA)