

皮膚感作性試験代替法 Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA)の  
評価会議報告書

JaCVAM 評価会議

平成 24 年（2012 年）7 月 4 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 生活衛生化学部）  
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 病理部）  
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 Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA)について、第三者評価委員会からの報告を受け<sup>1)</sup>、以下の9項目について審議した。本2～8項目はOECDガイダンス文書 No. 34に示された検討項目である<sup>2)</sup>。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. 検討対象の試験法は、日本のどの法規制やガイドラインに関係しているか。

Reduced local lymph node assay (rLLNA) は、化学物質の皮膚感作性を評価する試験法である。rLLNAの原理、試験手順及び判定基準は、既にOECDテストガイドラインに収載されているLocal lymph node assay (LLNA) と同一で、一用量のみで試験する点だけが異なる。

rLLNAは、医薬品、医療機器、医薬部外品又は化粧品原料、その他の物質又は製品に関する法規制又はガイドラインが求めている皮膚感作性に関係する。

2. 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。

ICCVAM は、第三者評価委員会を組織し、11施設で実施されたLLNAの試験成績を基に、rLLNAの試験法及び妥当性を評価した。その組織及び評価結果はICCVAMのホームページで公表されている。

また、我が国のrLLNA第三者評価委員会は、上記ICCVAMの結論を評価し、その結果を評価会議に提出した。この結果も、評価会議での審議が終了後公開される予定である。

よって、rLLNAは透明で独立な評価を受けていると判断する。

3. 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。

皮膚感作性物質は、適用部位の所属リンパ節を活性化する。従来のLLNAはこの原理に基づき、マウスに種々の濃度の被験物質を適用し、所属リンパ節細胞の増殖反応を<sup>3</sup>H-methyl thymidineの取り込みを指標として求め、皮膚感作性の有無を評価する。rLLNAも同様の原理に基づく試験法である。

LLNAでは適切な用量範囲で試験した場合、反応強度との間に用量相関性があるとされている。当該試験法で得られるデータは、最も反応が強く表れると想定される一用量での作用をとらえるものであるが、適切な用量が設定されれば、LLNAと同様に、ヒトに対する被験物質の皮膚感作性を十分に評価あるいは予測できるものである。

4. 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。

rLLNAは、被験物質の皮膚感作性の有無のみを評価するものであり、適用用量と皮膚感作性の程度との関係を調べるものではない。

5. 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。

rLLNA試験法とその妥当性を示すデータは、様々な用途で使用されている被験物質465物質について行われた11施設でのLLNAの試験成績を元にICCVAMが作成したものであり、その整合性を我が国のrLLNA第三者評価委員会で評価したものである。これらのデータによりrLLNAの皮膚感作性試験としての妥当性が示されている。よって、上記製品又は原料を幅広くカバーするデータが提供されていると見なせる。

当該試験法においては、過度の局所刺激性や明白な全身毒性を示さない最高用量で試験するが、LLNAと比較して1.9% (6/315) の偽陰性がみられている。その原因としては、設定された最高用量での反応性が低下したことが考えられる。

偽陰性の疑いがある場合は被験物質の毒性や物性等の情報を集め、また用量反応情報が必要な場合はLLNAを実施すべきである。

6. 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。

LLNA法と原理的に同じであることから、rLLNAの精度、施設内及び施設間再現性及び頑健性はLLNAと同等と考えられるが、一用量のみを用いることから、その用量の選定や被験物質の溶解性等により評価がばらつく可能性がある。よって本試験法は、ICCVAMが推奨する最新の試験計画書に準拠する必要がある。

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、上記の留意点以外においては、rLLNAはLLNAと比べて技術的に困難になることはなく、技術習得は容易である。

7. 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。

rLLNAは、LLNAと同じ試験手順をとることから、LLNAに対して時間的な優位性は小さいが、使用動物数を最大40%まで削減でき、経費的には優位である。

化学物質の皮膚感作性の有無を区別するために、まずrLLNAを実施し、偽陰性の可能性がある場合は被験物質の毒性や物性等の情報を集め、用量反応情報を得るためのLLNAの実施を考慮すべきである。

陽性反応が得られた場合において、行政上、その用量依存性が求められたときは追加試験が必要となる。

8. 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。

rLLNAは、被験物質を一用量のみで試験することにより従来のLLNAに比べて使用動物数を削減でき、かつ同等の精度を有する改訂試験法であることが、ICCVAM及び我が国のrLLNA第三者評価委員会で評価されている。

9. 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。

rLLNAは、医薬品、医療機器、医薬部外品又は化粧品の原料、並びにその他の物質又は製品の皮膚感作性の有無を評価するために有用である。

rLLNAでは用量反応情報は得られないため、リスクアセスメントを行うための評価用資料として利用するには不十分であるが、rLLNAで陰性と判定された物質は、他の科学的情報から皮膚感作性が疑われる可能性がある場合を除き、これ以上の皮膚感作性に関する試験を求めないとすることも可能である。

以上の審議の結果、JaCVAM 評価会議は、皮膚感作性試験代替法 rLLNA について以下のように結論した。

本試験法は、従来の LLNA を一用量で行い使用動物数を削減する改訂試験法であり、LLNA と同等の検出感度を有する。

本試験法は、最新の ICCVAM が推奨する試験計画書に準拠し、偽陰性（最高用量での反応低下等）の可能性を理解して適切に試験を実施し、結果を評価するとき、行政上のプログラムあるいは関係官庁が広く対象としている化学物質や製品の皮膚感作性の有無を科学的に評価できる。

#### 参考文献

1. 皮膚感作性試験代替法 Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA)の第三者評価報告書
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. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), National Toxicology Program (NTP), et al. Background Review Document: “*in vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral systemic Toxicity”, NIH Publication No: 07-4518