OECD/OCDE

2002/04/24

試験ガイドライン No.429

皮膚感作性：局所リンパ節試験

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません**。本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。

本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。

This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (2002), Test No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/topics/policy-sub-issues/testing-of-chemicals/previous-test-guidelines/section-4/replaced-test-guidelines/replaced-test-guideline-429-2002.pdf.

©OECD(2002)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at http://www.oecd.org/termsandconditions/

経済協力開発機構 （OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

429

2002 年 4 月 24 日採択

経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン

皮膚感作：局所リンパ節試験

はじめに

1. OECD 試験ガイドラインプログラムでは、科学的進歩および動物福祉の両方の観点から、試験法の開発および改良の進展を定期的に概観しガイドラインを最新のものにすべきか、または新しいガイドラインを作成すべきかを検討している。この目的に向けて、マウスにおける皮膚感作の新しい測定法、すなわち局所リンパ節試験法（LLNA）が十分に検証され、新しい試験ガイドラインとして採用することの妥当性が認められた(1)(2)(3)。これは、動物において化学物質の皮膚感作能を評価するために知られている 2 番目のガイドラインである。もう一つのガイドライン（406）はモルモットを用いた試験で、モルモットのマキシマイゼーション法およびビューラー法として有名である(4)。

2. LLNA には、科学的進歩および動物福祉の両面に関して確かな利点がある。LLNA では皮膚感作の誘導相を調べ、用量反応を知るためにふさわしい定量的なデータが得られる。LLNA の詳細な検証と関連する研究についての総説が刊行されている(5)(6)(7)(8)。更にモルモット試験法で推奨されている、弱／中等度の陽性対照物質は LLNA においても有用であることは注目すべきであろう(6)(8)(9)。

最初に考慮すべき事項

3. LLNA は皮膚感作性物質を同定することあるいは化学物質が皮膚感作を起こす能力がないことを確認するための代替法である。この手法は全ての場合に LLNA をモルモット試験の代替として使用すべきというのではなく、むしろ LLNA はモルモット法と同等の利点を持ち、陽性および陰性いずれの結果が出た場合にも、もはやそれ以上の確認試験を必要としない二者択一の方法として使用できる。

4. LLNA は *in vivo* 法であるから、接触感作活性の評価にあたって動物の使用を免れるものではない。しかしながら、試験に要する動物数を減らせる可能性はある。更に LLNA は、接触感作試験における動物の取り扱い方にかなりの改良をもたらす。LLNA は、感作の誘導相において化学物質により刺激される免疫学的事象を基に考えられたものである。モルモット試験とは異なり、LLNA では抗原の再投与（負荷試験）により皮膚過敏反応を惹起する必要がない。更に、モルモットのマキシマイゼーション法で用いるアジュバントの使用も LLNA では必要ない。したがって、LLNA では動物の苦痛を軽減することができる。伝統的なモルモット試験に対する LLNA のこのような利点にもかかわらず、（LLNA ではある種の金属に関して偽陰性の結果が、またある種の皮膚刺激物質では偽陽性の結果が得られるなど）限界があるため、伝統的なモルモット試験を行わざるを得ない場合があることを明記すべきである(10)。

試験の概要

5. LLNA の基本原理は、感作物質がその適用部位に開口しているリンパ節において最初にリンパ球の増殖を惹起するということにある。この増殖は適用された用量（およびアレルゲンの効力）に比例し、感作を客観的かつ定量的に測定できる簡単な方法となる。LLNA は、この増殖を用量反応として評価するが、その際、試験群の増殖が溶媒で処理された対照と比較される。溶媒対照群における増殖に対する投与群の増殖の比（刺激指数と称される）を決定し、この値が 3 以上でなければ感作物質としての可能性がそれ以上評価されることはない。ここに記される方法は、細胞の増殖を評価するのに放射性標識法を用いる。ただし、方法論の詳細と参考文献の網羅を含めて十分な科学的根拠と正当な理由があるなら、増殖測定のために別の評価項目を使用してもよい。

試験方法

動物種の選択

6. マウスが本試験の選択種になる。CBA/Ca または CBA/J 系統の未経産で非妊娠の若齢雌マウスを使用する。試験開始時、動物は 8～12 週齢で体重のばらつきは最小限にし、平均体重の 20%を超えないこととする。LLNA 応答について、系統および／または性特異的に有意差がないことを示す十分な科学的データが得られる場合には、上記以外の系統や雄マウスを使用してもよい。

飼育および給餌条件

7. 動物は個別に飼育する。動物飼育室の温度は 22°C ± 3°C とする。相対湿度は目標値を 50～60%とし、30%以上、70%を超えないこと（飼育室清掃時を除く）が望ましい。照明は人工照明で 12 時間明期、12 時間暗期とする。飼料としては通常の実験動物用飼料を用いてさしつかえない。飲水は自由に摂取させる。

動物の準備

8. 動物を無作為に選び、個体識別ができるようにマーク（耳につけることは不可）し、適用開始前に 5 日間以上それぞれのケージに飼育して飼育室環境に馴化させる。適用開始に先立って、肉眼的に識別できる傷が皮膚にないことを全ての動物で確認する。

信頼性のチェック

9. 測定が適正に実施されていること、および測定を満足に実施するための試験機関の適格性を示すために、陽性対照を用いる。陽性対照は、陰性対照群に比べて 3 を超える刺激指数（SI）の増加が予期される暴露量において、LLNA 応答が陽性でなければならない。陽性対照用量は、誘導が明確ではあるが過剰にならないように選択する。ヘキシルシンナミックアルデヒド（CAS 番号 101-86-0）およびメルカプトベンゾチアゾール（CAS 番号 149-30-4）が推奨される物質である。十分な正当な理由がある場合には、上述の基準を満たす限り、他の陽性対照物質を使用することができる。通常、陽性対照群は測定ごとに設定されるが、試験機関によっては過去 6 カ月以上にわたり首尾一貫して満足な反応が得られていることを示す陽性対照データが存在するという状況も出てくると予想される。そのような状況においては、陽性対照を設置する頻度を 6 カ月より短くしてもよい。陽性対照物質は一貫した

結果をもたらす溶媒（例えば、アセトン／オリーブ油）に溶解して使用するが、ある種の規制状態下では、（臨床的／化学的に適切な剤型であれば）非標準の溶媒に溶解して使用せざるを得ない可能性がある。そのような状況では、陽性対照とその非標準溶媒との相互作用を検査する必要がある。

試験の手順

動物数および投与量

10. 用量群あたり最低 4 匹の動物（被験物質あたり最低 3 濃度で）に加えて、被験物質用溶媒のみを処理した陰性対照群、および該当する場合には、陽性対照を設ける。各動物のデータを得る場合には、用量群あたり最低 5 匹の動物を用いる。用量および溶媒の選択は、参考文献(2)に推奨されている事項に従って決定する。100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、１%、0.5%などの一連の濃度から選択する。急性毒性データおよび皮膚刺激性データが得られている場合には、これを参考にして、3 つの連続した濃度のうちの最高濃度を適用した場合に全身性毒性および過度な局所皮膚刺激を回避しながら最大の暴露量が得られるように用量を設定する(2)(11)。対照群の動物は、被験物質を投与しないこと以外、投与群の動物と同様に取り扱う。

11. 溶媒としては、被験物質の適用にふさわしい溶液／懸濁液を作製し、被験物質の濃度および溶解性を最大にすることを基準に選択する。溶媒は推奨順にアセトン／オリーブ油（4:1 v/v）、ジメチルホルムアミド、メチルエチルケトン、プロピレングリコールおよびジメチルスルホキシドとなるが、十分な科学的根拠が示されれば、これら以外の溶媒を使用してもよい。また場合によっては、臨床的にふさわしい溶媒または被験物質の市販製剤を追加の対照として設置する必要も生じるであろう。水溶性物質については、皮膚を湿らせる溶媒に十分に混合され、ただちに流出しないように工夫するなど特別な注意が必要である。このような理由で、完全な水性溶媒は避けるべきである。

実験スケジュール

12. 試験の実施スケジュールは以下のとおりである。

- 第 1 日
  各動物を同定し、体重を記録する。被験物質、溶媒のみ、または陽性対照（該当する場合）の適切な希釈液 25 μL を耳背部に適用開始する。

- 第 2 日および第 3 日
  第 1 日に実施した適用手順を繰り返す。

- 第 4 日および第 5 日
  無処置。

- 第 6 日
  動物の個体ごとの体重を記録する。20 μCi（7.4e＋5 Bq）の ^{3}H-methyl thymidine を含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS）250 μL を全ての被験物質処理マウスおよび対照マウスに尾静脈から注射する。別の方法としては、^{125}I-Iododeoxyuridine を 2 μCi（7.4e＋4 Bq）と 10^{-5}M fluorodeoxyuridine を含む PBS 250 μL を全てのマウスに尾静脈から注射する。5 時間後、動物を屠殺する。各耳から耳介リンパ節を採取し、実験群ごとに PBS 中にプールする（プール処理群アプローチ）。もう一つの方法は、対の耳介リンパ節を動物ごとに採取し、

それぞれ PBS 中にプールする（動物個体アプローチ）。リンパ節の同定および切除に関する詳細と図については、代替法評価調整委員会（ICCVAM）の免疫毒性学ワーキンググループ LLNA プロトコールの補遺 1(10)で見ることが出来る。

細胞懸濁液の準備

13. リンパ節細胞（LNC）の単一細胞懸濁液は、プール処理群から得られたリンパ節でも各動物の両側耳から得られたものでもよく、200 μm メッシュのステンレススチールガーゼを通して穏やかな機械的解離により調製できる。リンパ節細胞は過剰の PBS で 2 回洗浄し、5%のトリクロロ酢酸（TCA）溶液に 4°C で 18 時間放置して沈殿させる。沈殿物を 1 mL の TCA に再懸濁し、^{3}H を計測するためのシンチレーション液 1 mL を含むシンチレーションバイアルに移すか、または ^{125}I を計測するためのγカウンティングチューブに直接移す。

細胞増殖（取り込まれた放射活性）の測定

14. 取り込まれた ^{3}H-methyl thymidine はβシンチレーションカウンターで 1 分あたりの崩壊数（DPM）として計測される。^{125}I の計測により、^{125}I-Iododeoxyuridine の取り込みが測定され、DPM として表される。使用したアプローチ法により、取り込みは各投与群の DPM（プールアプローチ）、または各動物の DPM（個体アプローチ）として表わす。

観察

一般状態観察

15. 動物の適用部位における局所刺激性、あるいは全身性毒性に関する一般徴候の有無について、1 日 1 回注意深く観察する。全ての観察事項は各動物で体系的に記録し、維持する。

体重

16. 段落 12 に述べたように、動物の個体ごとの体重は試験開始時および予定された屠殺時に測定する。

結果の計算

17. 結果は刺激指数（SI）として表す。プールアプローチを用いた場合は、各投与群のプール放射活性取り込みをプール対照群の取り込みで割り算することにより得られる。これにより平均 SI が得られる。個体アプローチを用いた場合には、各被験物質群および陽性対照群内の平均 DPM／マウス一個体を、溶剤／溶媒対照群の平均 DPM／マウス一個体で割り算することによって得られる。したがって、溶媒投与群の平均 SI は 1 になる。

18. 個体アプローチを用いて SI を計算すると、データの統計解析が可能となる。適切な統計解析手法を選ぶにあたり、研究者は分散が同等でない可能性やその他関連する問題の可能性を常に意識する必要がある。そのような可能性がある場合には、データの変換やノンパラメトリック統計解析が必要になるだろう。データの解析にあたって採用する方法は、投与群および溶媒対照群の各データを評価して、信頼限界を考慮に入れながら最適用量反応曲

線を得ることである。ただし、研究者はまた、群内の各動物の反応について「異常値」がある可能性についても注意する。そのような場合には反応のもう一つの尺度として（平均値よりも中央値を）使用するか、または異常値を除外する必要がある。

19. 陽性反応と判断するための条件は、刺激指数が 3 以上であること、用量反応性があること、更に該当する場合には、統計的な有意差があることなどである(3)(6)(10)(13)(14)。

20. 得られた結果を明らかにするためには、被験物質の様々な特性、すなわち既知の皮膚感作物質と構造的な関係があるかどうか、過剰な皮膚刺激性があるかどうか、また得られた用量反応の性質などを考慮する必要がある。これらやその他考慮すべき事項については、詳細に議論されている(7)。

データおよび報告

データ

21. データは総括表にまとめ、平均値、個々の DPM 値、ならびに各用量群（溶媒対照群を含む）の刺激指数を示さなければならない。

試験報告書

22. 試験報告書には、以下の情報を含まなければならない。

被験物質
- 特定データ（CAS 番号（あれば）、供給元、純度、既知の不純物、ロット番号）
- 物理的性質および物理化学的性状（揮発性、安定性、溶解性）
- 混合物である場合は、組成および成分の相対的百分率

溶媒
- 識別データ（純度、該当する場合は濃度、使用容量）
- 選択の妥当性

供試動物
- 使用したマウスの系統
- 分かっている場合、動物の微生物学的状態
- 動物数、週齢、性
- 動物の供給元、飼育条件、飼料など

試験条件
- 被験物質の調製および適用の詳細
- 用量設定根拠（実施した場合には、用量設定試験の結果も含める）
- 溶媒および被験物質の使用濃度、ならびに適用した物質の総量
- 飼料および飲料水の質に関する詳細（飼料の種類／供給元、水源を含む）

信頼性チェック
- 使用した物質、濃度、溶媒の情報を含む最新の信頼性チェックの結果の要約
- 試験機関における陽性対照および陰性対照に関する、現在および／または背景のデータ

結果
- 適用開始時および予定された屠殺時の動物の個体ごとの体重
- 平均値／中央値（プールアプローチ）および個体別 DPM（個体アプローチ）、両アプローチにおける値の範囲、および各用量群（溶媒対照群を含む）の刺激指数の表
- 該当する場合、統計解析
- もしあれば、各動物の適用部位の皮膚過敏反応を含む毒性の徴候と発現時間の経過

結果の考察
- 被験物質が皮膚感作物質であるか否かに関する結論を盛り込んだ結果、用量反応解析および統計解析（該当する場合）に関する短評

参考文献

(1) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. Food and Chemical Toxicology 30, 165-169.

(2) Kimber, I. Dearman, R.J. Scholes E.W, and Basketter, D.A (1994). The local lymph node assay: developments and applications. Toxicology, 93, 13-31.

(3) Kimber, I. Hilton, J. Dearman, R.J. Gerberick, G.F. Ryan, C.A. Basketter, D.A. Lea, L. House, R.V. Ladies, G.S. Loveless, S.E. Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. Journal of Toxicology and Environmental Health, 53 563-79 (1998).

(4) OECD (1992). Guideline 406 Skin Sensitisation.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. Food and Chemical Toxicology, 34, 999-1002.

(6) Basketter, D.A. Gerberick, G.F. Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996). The local lymph node assay A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food and Chemical Toxicology, 34, 985-997.

(7) Basketter, D.A. Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food and Chemical Toxicology. (in press) 36 327-33.

(8) Van Och, F.M.M, Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicology 146 49-59.

(9) Dearman, R.J. Hilton, J. Evans, P. Harvey, P. Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. Journal of Applied Toxicology 18 281-4.

(10) National Institute of Environmental Health Sciences (1999). The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494, Research Triangle Park, N.C. (http://iccvam.niehs.nih.gov).

(11) OECD (2002). Guideline 404 Acute Dermal Irritation/Corrosion.

(12) Basketter, D.A. Selbie, E. Scholes, E.W. Lees, D. Kimber, I. and Botham, P.A. (1993). Results with OECD recommended positive control sensitisers in the maximisation. Buehler and local lymph node assays. Food and Chemical Toxicology, 31, 63-67.

(13) Basketter DA, Lea LJ, Dickens A, Briggs D, Pate I, Dearman RJ, Kimber I (1999). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. J. Appl. Toxicology, 19, 261-266.

(14) Basketter DA, Blaikie L, Derman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, Evans P, White IR, and Rycroft RTG (2000). Use of local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. Contact Dermatitis, 42, 344-48.