OECD/OCDE

2010/07/22

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.

Reference:

OECD (2026), Test No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264071100-en.

©OECD (2010)

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

2010 年 7 月 22 日採択

化学物質の試験に関する OECD ガイドライン

皮膚感作性：局所リンパ節試験

はじめに

1. 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は、科学の進歩、規制要件の変化、動物福祉への配慮に照らして定期的に見直されている。マウスにおける皮膚感作性の測定法、すなわち局所リンパ節試験（LLNA：TG 429）法の試験ガイドライン（TG）初版は 2002 年に採択され(1)、LLNA の詳細なバリデーションと関連する研究についての総説が発表されている(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)。今回行った LLNA の更新は、経験および科学データの評価(12)に基づくものである(12)。TG 429 は、動物において化学物質の皮膚感作性の可能性を評価するためにデザインされた 2 番目の TG である。もう 1 つの TG（すなわち TG 406）はモルモットを用いた試験で、特にマキシマイゼーション法およびビューラー法が用いられている(13)。LLNA は動物福祉に関して TG 406 (13)より優れている。この改訂版 LLNA の TG には一連の性能標準（PS）（補遺 1）が掲載されており、これは、ガイダンス文書 34（Guidance Document No. 34）(14)の原則に従って、LLNA と機能および仕組みが類似している新規あるいは改変試験法のバリデーション状態の評価に使用できる。

2. LLNA では皮膚感作性の誘発時において、用量反応の評価に適した定量的なデータが得られる。モルモット試験法（すなわち TG 406）(13)に適した陽性対照（PC）試験に用いる物質として推奨される軽度／中等度の感作性物質は、LLNA での使用にも適していることに留意されたい(6)(8)(15)。単群局所リンパ節試験（rLLNA）法は、最大 40%まで動物の使用を削減可能な方法であり、当試験法も TG 429 の選択肢として記載されている(16)(17)(18)。rLLNA は、本試験ガイドラインに記載されている、他の LLNA プロトコル仕様を全て遵守している条件の下、皮膚感作性の可能性の予測が陰性であることを確認するよう規制上必要とされる場合、用いることができる。結果が陰性であるという予測は、段落 4 記載の入手可能な情報全てに基づいて行われるべきである。rLLNA 法の適用前に、rLLNA 法を用いる明確な正当性および科学的根拠を示すべきである。rLLNA から予測に反し陽性または不明確な結果が得られた場合、その結果の解釈または明確化のため追加試験を要することがある。rLLNA は、用量反応情報が必要とされる場合（国連化学品の分類および表示に関する世界調和システム（GHS）

©OECD, (2010)
本資料は、個人的な非営利目的であれば、出典を適切に明記するという条件で、OECD に事前の承諾を得ることなく自由に使用してよい。本資料を商業的に利用する場合は、必ず OECD の書面による承諾を得なければならない。

の下位カテゴリー化など）、皮膚感作性を有する被験物質の危険有害性の特定に用いるべきではない。

定義

3. 用語の定義を補遺 2 に示す。

最初に考慮すべき事項および限界

4. LLNA は、皮膚感作性の可能性がある被験物質同定に用いられる代替法である。このことは、あらゆる場合に、モルモット試験（すなわち TG 406）(13)の代わりに LLNA を用いるべきであることを必ずしも意味するわけではなく、LLNA にはモルモット試験と同等の利点があるということであり、また、陽性および陰性という結果について、一般にはもはやさらに確認する必要がない代替法として使用可能であるということである。試験施設は、試験実施前に被験物質に関する入手可能な全ての情報を考慮すべきである。そうした情報として考えられるのは、被験物質の同一性および化学構造、物理化学的性質、被験物質に関する他の *in vitro* または *in vivo* 毒性試験の結果、ならびに構造的に関連する被験物質の毒性学的データなどである。LLNA が被験物質に適しているか（LLNA を用いた場合、限られたタイプの被験物質には不適合であることを前提に―段落 5 参照）判断し、用量の選択を促進するには、この情報を考慮すべきである。

5. LLNA は *in vivo* 試験法であるから、アレルギー性接触感作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、評価に要する動物数削減の可能性はある。さらに LLNA は、アレルギー性接触感作性試験における動物の取り扱い方にかなりの改善（疼痛および苦痛の軽減）をもたらす。LLNA は、感作性の誘発時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（すなわち TG 406）(13)とは異なり、LLNA では負荷試験により皮膚過敏反応を惹起させる必要がない。さらに、モルモットマキシマイゼーション法の場合のように、アジュバントの使用が LLNA では必要ない(13)。したがって、LLNA では動物の疼痛および苦痛が軽減される。LLNA には TG 406 を上回る利点があるが、ある種の限界があるため TG 406 (13)を用いざるを得ない場合があることを認識すべきである（例えば、LLNA において、ある種の金属の結果にみられる偽陰性、ある種の皮膚刺激物質［一部の界面活性剤タイプの化学物質など］の結果にみられる偽陽性(19)(20)、または被験物質の溶解度）。加えて、被験物質のクラス、または可能性として交絡因子の作用を示す官能基を含む物質(21)では、モルモット試験（すなわち TG 406）(13)を用いざるを得ない場合がある。さらに、主に農薬製剤からなる限られたバリデーションデータベースに基づくと、LLNA の場合、こうした農薬製剤タイプの被験物質では、陽性の結果になる可能性がモルモット試験より高い(22)。ただし、製剤の試験を行う場合、LLNA が適切に機能していることを示すベンチマーク物質として、結果が既知の類似の被験物質などを考慮することが考えられる（段

© OECD, (2010)

落 16 参照）。こうした特定の限界以外に、LLNA の正確性を妨げ得る被験物資に関わる特性でない限り、いずれの被験物質の試験にも LLNA を適用すべきである。

試験の概要

6. LLNA の基本原理は、感作性物質が被験物質適用部位の流入領域リンパ節で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アレルゲンの用量および効力に比例し、感作性を定量的に測定できる簡単な方法となる。増殖は、各試験群の増殖の平均値と、媒体対照（VC）群の増殖の平均値との比較により測定される。各試験群の増殖の平均値と、同時 VC 群の増殖の平均値との比は、刺激指数（SI）と呼ばれ、本指数が測定される。被験物質について、皮膚感作性物質の可能性ありとの分類が正当化される SI は、3 以上とする。本ガイドラインの記述は、*in vivo* 放射性標識法を用いて、流入領域耳介リンパ節の増殖細胞数の増加を測定する方法に基づいている。ただし、PS の要件が完全に満たされる場合、増殖細胞数評価のために別の評価項目を使用してもよい（補遺 1）。

試験方法

動物種の選択

7. 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成熟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。ただし、LLNA 応答について、系統や性特異的に有意差がないことを示す十分な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

8. マウスを個別飼育する適切な科学的根拠がない限り、マウスは集団飼育する(23)。動物飼育室の温度は 22℃±3℃ とする。相対湿度は少なくても 30%、できれば飼育室清掃時を除き 70%を超えないこととし、目標値を 50～60%とすべきである。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

9. 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、投与開始前に 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。投与開始に先立って、識別可能な皮膚損傷がないことを全ての動物で確認する。

© OECD, (2010)

投与液の調製

10. 固体の被験物質は溶媒／媒体に溶解するか懸濁させ、マウス耳介への適用前に必要に応じて希釈する。液体の被験物質は、投与前に希釈しなくても、希釈してから適用してもよい。医療機器に一般にみられる物質など不溶性物質は、適切な溶媒で過剰に抽出し、試験において抽出可能な成分を全て明らかにしてからマウス耳介に適用する。被験物質は、安定性データにより保存の許容性が認められない限り毎日調製する。

信頼性のチェック

11. 感作性を有する被験物質に対し、反応の大きさを明確に特徴づけるのに十分かつ再現可能な感度で反応させることにより、試験が適切に行われていることを示すには、陽性対照を用いる。同時 PC により、施設に各試験の実施を成功する能力があると証明され、施設内および施設間の再現性および相互比較の評価が可能になることから、同時 PC を含めることが推奨される。試験ごとに PC を置くよう要求する規制当局もあるので、ユーザーは LLNA 実施前に関連規制当局に相談することが奨励される。したがって、定期的な PC 使用から生じ得る要件を満たすため、追加的な動物試験の必要性を回避するには、同時 PC を定期的に用いることが奨励される（段落 12 参照）。PC は、陰性対照（NC）群に比べて 3 を超える SI の増加が予測される曝露量において、LLNA 応答が陽性でなければならない。PC の用量は、過剰な皮膚刺激性も全身毒性も起こさず、感作性に再現性はあるが過剰（すなわち SI が 20 を超える）にならないよう選択する。推奨される PC 物質は、25%ヘキシルシンナミックアルデヒド（CAS 番号 101-86-0、媒体はアセトン：オリーブ油（4：1、v/v））、および 5%メルカプトベンゾチアゾール（CAS 番号 149-30-4、媒体は *N,N*-ジメチルホルムアミド）である（補遺 1-表 1 参照）。状況により、十分な正当性がある場合には、上述の基準を満たす限り、他の PC 物質を使用することができる。

12. 同時 PC 群を含めることが推奨される一方、PC 物質の定期的な（すなわち 6 ヵ月以内の間隔での）試験を行えば十分である状況が考えられる。そうした状況が考えられるのは、施設が LLNA を定期的に実施（すなわち 1 ヵ月に 1 回ほどの頻度で LLNA を実施）し、また施設が背景 PC データベースを確立し、PC により再現性がある正確な結果を入手できることが立証される場合である。PC を用いて、妥当な期間内（すなわち 1 年未満）に独立した試験を 10 回以上行い、一貫して結果が陽性であれば、LLNA の習熟度が十分であることを支障なく立証できる。

13. LLNA の手順に変更が生じた場合（例えば、訓練を受けた人員の変更、試験法に用いる材料や試薬の変更、試験法に用いる機器の変更、供試動物供給元の変更）、常に同時 PC 群を含め、その変更事項を実験報告書に記載する。こうした変更が、変更前に確立された背景データベースの妥当性に及ぼす影響について、PC による結果の記録の一貫性から、新たな背景データベース確立の必要性を判断する際に検討すべきである。

© OECD, (2010)

14. PC 試験を同時ではなく定期的に行う判断については、それぞれの定期的な PC 試験の合間に同時 PC を置かずに得られた試験結果が陰性であると、その妥当性および許容性に影響が生じることを試験担当者は留意すべきである。例えば、定期的な PC 試験で偽陰性の結果が得られている場合、被験物質の結果が陰性であると、許容可能な最新の結果どおり偽陰性なのか、許容不能である真の陰性が得られたのか、その隔たりに疑義が生じ得る。同時 PC を含めるか、定期的な PC 試験のみ実施するかを判断する場合、その結果が示す意味を慎重に検討すること。また、同時 PC 群に用いる動物の削減が科学的に正当化される場合、および施設特異的な背景データに基づいて用いるマウスの削減が施設により立証される場合、そのことも検討する(12)。

15. PC 物質は、一貫した反応を示すことが知られている媒体（例えばアセトン：オリーブ油（4：1、v/v））で検討すべきであるが、ある種の規制条件下では、非標準的な媒体（臨床的／化学的に関連する製剤）を用いる試験が必要とされることも考えられる(24)。同時 PC 物質を被験物質とは異なる媒体で検討する場合、同時 PC とは別に VC を含める。

16. 特異的な化学クラスまたは反応範囲の被験物質が評価中である場合、そうしたタイプの被験物質について、試験法に、皮膚感作性の可能性の適切な検出機能があることを示すには、ベンチマーク物質が有用であることもある。適切なベンチマーク物質は、以下の特性を有する。

- 対象とする被験物質のクラスに類似した構造および機能を有すること
- 物理的／化学的特性が既知であること
- LLNA から得られた裏づけデータがあること
- 他の動物モデルやヒトから得られた裏づけデータがあること

試験の手順

動物数および投与量

17. 投与群あたり最低 4 匹の動物（被験物質あたり最低 3 濃度で）に加えて、被験物質用媒体のみで処置した同時 NC 群、および PC（段落 11～15 を検討する際の施設の方針に基づいて、同時または直近）を設ける。複数の用量による PC 試験を、特に PC 試験を間欠的に行う場合には検討すべきである。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い処置する。

18. 用量および媒体の選択は、参考文献(3)および(5)の推奨事項を基準とする。連続的な用量は、通常 100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、１%、0.5%など一連の適切な濃度から選択する。使用する一連の濃度選択には、適切な科学的根拠を伴うこと。既存の全ての毒性学的情報（例えば急性毒性および皮膚刺激性）、ならびに目的とする被験物質（あるいは構造的に関連す

© OECD, (2010)

る被験物質）の構造および物理化学的情報については、最大濃度により曝露量が最大になる一方、全身毒性や過剰な局所皮膚刺激性を回避するような連続 3 段階の濃度を選択する際、入手可能であれば検討すべきである(3)(25)。そのような情報がない場合、最初に予備スクリーニング試験を要することがある（段落 21～24 参照）。

19. 媒体は試験結果の妨げや偏りとなってはならず、被験物質の適用に適した溶液／懸濁液になると共に、達成可能な最大濃度を得るため、溶解度の最大化を基準に選択する。推奨される媒体はアセトン：オリーブ油（4：1、v/v）、*N,N*-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(19)であるが、十分な科学的根拠があればそれ以外の媒体を使用できる。ある種の状況下では、臨床的に関連する溶媒、または被験物質の市販製剤を追加的な対照として用いる必要があり得る。親水性物質は、適切な可溶化剤（例えば 1% Pluronic® L92）の混合により媒体系に取り込み、媒体系が皮膚を湿らせ直ちに流出しないよう特に注意を払うべきである。そのため、完全な水性媒体は回避する。

20. 個体マウスのリンパ節を処理することにより、動物間のばらつきの評価、および被験物質群と VC 群の測定値の差について統計学的比較が可能になる（段落 35 参照）。また、個体マウスのデータを収集すると、PC 群のマウス数削減の可能性について検討できる(12)。さらに、一部の国の規制当局では、動物の個体別データの収集を必要とする。それでも、規制当局によってはプールされた動物のデータを許容可能とみなすことがあり、そうした状況のガイドライン利用者には、個体かプールされた動物のデータのいずれを収集するか選択肢があると考えられる。

予備スクリーニング試験

21. 実施試験における最大投与量を決定する情報がない場合（段落 18 参照）、LLNA での検討に適した投与量を定義するため、予備スクリーニング試験を行う。予備スクリーニング試験の目的は、全身毒性（段落 24 参照）や過剰な局所皮膚刺激性（段落 23 参照）を引き起こす濃度情報が入手できない場合、LLNA の主試験で用いる最大投与量を選択する手引きとすることにある。実施試験における最大投与量は、液体の被験物質では 100%、固体または懸濁液では可能な限り最大の濃度とする。

22. 予備スクリーニング試験は、リンパ節増殖の評価をしないこと、および投与群あたり用いる動物の削減以外、LLNA の主試験と同一条件下で実施する。投与群あたり 1 匹か 2 匹であることが示唆される。全てのマウスを対象に、全身毒性または適用部位の局所刺激性の徴候について毎日観察する。体重を試験前および終了前（第 6 日）に記録する。各マウスの両耳の紅斑を観察し、表 1 を用いてスコアを求める(25)。耳介の厚さは、厚み計（例えば、デジタル式マイクロメータまたは Peacock Dial 厚み計）を用いて、第 1 日（投与前）、第 3 日（初回投与から約 48 時間後）、第 6 日に測定する。さらに、第 6 日に耳介の厚さを耳パンチ重量測

© OECD, (2010)

定法により測定することが考えられるが、本測定法は動物を人道的に屠殺後実施する。過剰な局所皮膚刺激性は、いずれの測定日であっても、紅斑スコアが 3 以上あるいは耳介の厚さが 25%以上の増加により示される(26)(27)。LLNA の主試験で選択される最大投与量は、全身毒性や過剰な局所皮膚刺激性を引き起こさない一連の予備スクリーニング濃度（段落 18 参照）の中で、最大の用量に次ぐ用量とする。

表 1：紅斑スコア

観察結果	スコア
紅斑なし	0
ごく軽度の紅斑（かろうじて識別できる）	1
はっきりした紅斑	2
中等度から重度の紅斑	3
重度の紅斑（ビート様の赤色）から紅斑をグレード付けできない痂皮形成	4

23. LLNA では、耳介の厚さが 25%上昇した場合(26)(27)に加え、投与マウスの耳介の厚さが対照マウスに比べ統計学的に有意に増加した場合も、刺激性物質の同定に用いられてきた(28)(29)(30)(31)(32)(33)(34)。しかし、耳介の厚さが、統計学的に有意に増加する場合があっても 25%未満の場合には、過剰な刺激性との特異的な関連は認められていない(30)(32)(33)(34)。

24. 以下の一般状態の観察結果は、全体的な評価の一部として用いられた場合には全身毒性(35)(36)を示すと考えられ、したがって LLNA の主試験に用いる最大投与量を示し得る。神経系機能の変化（例えば、立毛、運動失調、振戦、痙攣）、行動変化（例えば、攻撃性、毛づくろい行動の変化、活動レベルの顕著な変化）、呼吸パターンの変化（すなわち、呼吸困難、喘ぎ呼吸、ラ音など呼吸の頻度および程度の変化）、ならびに摂餌量および摂水量の変化。なお、嗜眠や無反応の徴候、ならびに軽微または一時的な疼痛および苦痛を上回る徴候、あるいは 5%を超える体重減少が第 1 日～第 6 日に認められた場合、ならびに死亡については、評価の際に考慮すべきである。瀕死の動物、または明らかな疼痛もしくは重度の永続的な苦痛の徴候を示す動物は、人道的に屠殺する(37)。

主試験の実験スケジュール

25. 本試験の実験スケジュールは以下のとおりである。

– *第 1 日：*
個体識別を行い、各動物の体重および一般状態を記録する。被験物質、媒体のみ、または PC（段落 11～15 を検討する際の施設の方針に基づいて、同時または直近）の適切な希釈液 25 µL を耳背部に適用する。

© OECD, (2010)

– *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（7.4×10^5 Bq）のトリチウム標識（^{3}H）-メチルチミジン含有滅菌リン酸緩衝生理食塩水（PBS）250 μL を全ての被験マウスおよび対照マウスに尾静脈から注射する。代替として、^{125}I-ヨードデオキシウリジン 2 μCi（7.4×10^4 Bq）およびフルオロデオキシウリジン 10^{-5}M 含有滅菌 PBS 250 μL を全てのマウスに尾静脈から注射する。5 時間後、動物を人道的に屠殺する。個体別に、各マウスの耳から流入領域耳介リンパ節を切除し同時に PBS 中で処理する（動物個体方式）。代替として、投与群別に、切除後各耳のリンパ節を PBS 中にプールする（プール処理群方式）。本リンパ節の同定および切除に関する詳細および図については、参考文献(12)にみられる。LLNA の主試験において、局所皮膚反応をさらにモニターするには、耳の紅斑のスコア化、または耳の厚さの測定（厚み計または剖検時の耳パンチ重量測定法により入手）など追加的なパラメータを本試験プロトコルに含めることができる。

細胞懸濁液の調製

26. 動物個体方式またはその代替法であるプール処理群方式により、両耳から切除されたリンパ節細胞（LNC）の単一細胞懸濁液は、200 ミクロンのメッシュステンレススチールガーゼまたは別の許容可能な単一細胞懸濁液作成法を通じ、穏やかな機械的分散により調製される。LNC は多量の PBS で 2 回洗浄し、5%トリクロロ酢酸（TCA）に 4°C で 18 時間放置して DNA を沈殿させる(3)。沈殿物を 1 mL の TCA に再懸濁し、^{3}H 計数用のシンチレーション液 10 mL 含有シンチレーションバイアルに移すか、または ^{125}I 計数用の γ 計数管に直接移す。

細胞増殖（取り込まれた放射能）の測定

27. 取り込まれた ^{3}H-メチルチミジンは β シンチレーションカウンターで壊変毎分（DPM）として計測される。取り込まれた ^{125}I-ヨードデオキシウリジンは ^{125}I の計数により測定され、こちらも DPM として表される。使用した方式法により、取り込みは DPM／マウス（動物個体方式）、または DPM／投与群（プール処理群方式方式）として表す。

rLLNA

28. ある種の状況において、本 TG の他の LLNA プロトコル仕様を全て遵守している条件の下、皮膚感作性の可能性の予測が陰性であることを確認するよう規制上必要とされる場合、選択

© OECD, (2010)

肢として動物の使用を削減する rLLNA プロトコル(16)(17)(18)を用いることができる。rLLNA 法の適用前に、rLLNA 法を用いる明確な正当性および科学的根拠を示すべきである。陽性または不明確な結果が得られた場合、その結果の解釈または明確化のため追加試験を要することがある。

29. 投与群の数の削減が、LLNA と rLLNA 法プロトコルとの唯一の差であり、このため rLLNA は用量反応情報を提示しない。したがって、rLLNA は用量反応情報が必要とされる場合、用いるべきではない。複数の用量を用いる LLNA と同様、rLLNA で評価される被験物質の濃度は、マウスに明確な全身毒性や過剰な局所皮膚刺激性を引き起こさない最大濃度にすべきである（段落 18 参照）。

観察

一般状態観察

30. 各マウスの適用部位における局所刺激性、あるいは全身毒性に関する徴候の有無について、少なくとも 1 日 1 回注意深く観察する。個体別に続けられている記録については、全ての観察事項を体系的に記録する。モニタリング計画には、安楽死を支持する全身毒性、過剰な局所皮膚刺激性、または皮膚腐食性を示したマウスを直ちに同定する基準について記載する(37)。

体重

31. 段落 25 で述べたように、動物の個体ごとの体重は試験開始時および予定された人道的屠殺時に測定する。

結果の算出

32. 各投与群の結果を SI として表す。動物個体方式を用いた場合、SI は各被験物質群および PC 群内の平均 DPM／マウスを、溶媒／VC 群の平均 DPM／マウスで除算することによって得られる。したがって、VC 群の平均 SI は 1 になる。プール処理群方式を用いた場合、SI は各投与群のプールされた放射能取り込みを、VC 群のプールされた取り込みで除算することによって得られ、これにより平均 SI が求められる。

33. 判断の過程では、SI が 3 以上の場合、結果を陽性とみなす。ただし、境界線上の結果が陽性を示すか判定する場合、用量反応の強さ、統計的有意性、ならびに溶媒／媒体および PC の反応の一貫性が用いられることもある(4)(5)(6)。

34. 得られた結果を明らかにする必要がある場合、被験物質の様々な特性、すなわち既知の皮膚感作性物質と構造的な関係があるかどうか、マウスに過剰な局所皮膚刺激性があるかどうか、

© OECD, (2010)

また認められた用量反応関係の性質などを考慮すべきである。上記その他の考慮事項については、詳細な議論が行われている(7)。

35. 放射能に関するデータをマウス個体レベルで収集すると、データにおける用量反応関係の存在および程度について統計解析が可能になる。統計による評価には、用量反応関係の評価や、適切に調整された被験群の比較（例えば、投与群対同時 VC 群の対比較）などが挙げられる。統計解析には、例えば用量反応の傾向の評価には直線回帰やウィリアムズ（Williams）検定、対比較にはダネット（Dunnett）検定が挙げられる。適切な統計解析法を選択する際、分散の不均一性、またそれ以外にデータ変換やノンパラメトリック統計解析を必要とし得る統計関連の問題が起こる可能性があることを、試験担当者は留意すべきである。いずれの場合も、試験担当者は、特定のデータポイント（「外れ値」と呼ばれることもある）を含める場合と含めない場合とで、SI の算出および統計解析を行う必要があると考えられる。

データおよび報告

データ

36. データは表形式にまとめる。動物個体方式を用いた場合、動物の個体別の DPM 値、群の平均 DPM／動物、平均値と関連する誤差項（例えば SD、SEM）、および同時 VC 群と比較した各投与群の平均 SI を示す。プール処理群方式を用いた場合、DPM の平均値／中央値、および同時 VC 群と比較した各投与群の平均 SI を示す。

試験報告書

37. 試験報告書には、以下の情報を含まなければならない。

被験物質および対照物質

- 特定データ（例えば、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（例えば、揮発性、安定性、溶解度）
- 製剤である場合は、組成および成分の相対的百分率

溶媒／媒体

- 特定データ（純度、該当する場合は濃度、使用容量）
- 媒体選択の妥当性

供試動物

- CBA マウスの供給元
- わかっている場合、動物の微生物学的状態
- 動物数、週齢

© OECD, (2010)

– 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
– 用量選択の妥当性（予備スクリーニング試験を実施した場合には、その結果を含む）
– 媒体および被験物質の使用濃度、ならびに適用した被験物質の総量
– 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）
– 投与およびサンプリングのスケジュールの詳細
– 毒性の測定法
– 試験の陽性または陰性の検討基準
– プロトコルからの逸脱の詳細、ならびにその逸脱が試験デザインおよび結果にどのような影響を及ぼしたかについての説明

信頼性チェック

– 使用した被験物質、濃度、媒体の情報を含む最新の信頼性チェックの結果の要約
– 試験施設における同時あるいは背景 PC ならびに同時 NC データ
– 同時 PC を含めなかった場合には、直近の定期的な PC の日付および実験報告書、ならびに施設が同時 PC により行わない根拠を示す背景 PC データの詳細を記載した報告書

結果

– 投与開始時および予定された屠殺時のマウス個体ごとの体重、ならびに投与群ごとの平均値および関連する誤差項（例えば SD、SEM）
– もしあれば、各動物の投与部位の皮膚刺激性を含む毒性の発現および徴候の経時変化
– マウス個体ごとの DPM 値（動物個体方式）または DPM の平均値／中央値（プール処理群方式）、および投与群ごとの SI 値の表
– 動物個体方式を用いた場合、投与群ごとの DPM／マウスの平均値および関連する誤差項（例えば SD、SEM）、ならびに投与群ごとの外れ値解析の結果
– 動物個体方式を用いた場合、算出された SI、および被験物質群と対照群双方の動物間のばらつきを考慮に入れた、ばらつきの適切な処置
– 用量反応関係
– 該当する場合、統計解析

結果の考察

– 被験物質が皮膚感作性物質であるとみなされるべきか否かに関する結論を示した、結果、用量反応解析および統計解析（該当する場合）の短評

© OECD, (2010)

LITERATURE

(1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

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

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

(4) 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. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health,* 53, 563-79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 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 Chem. Toxicol*., 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 Chem. Toxicol*., 36, 327-33.

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and 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, *Toxicol*., 146, 49-59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol,* 34: 258-273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol,* 34, 274-286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol,* 34: 249-257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

© OECD, (2010)

(14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) 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, *J. Appl. Toxicol*., 18, 281-284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitization: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.

(17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Available at: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

(18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(19) ICCVAM (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 Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitizing potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896-1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, 90-96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

© OECD, (2010)

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol*., 238, 71-89.

(25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Available at: [http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug. Chem. Toxicol*., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitization and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitization by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) OECD (1987*), Acute Dermal Toxicity,* OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation,* Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

© OECD, (2010)

補遺 1

提唱される類似または改変 LLNA による皮膚感作性試験法の評価に関する性能標準

はじめに

1. 性能標準（PS）の目的は、新規試験法が占有（すなわち著作権、登録商標、登録）の有無に関わらず、特定の試験目的に合った十分な正確性および信頼性を有すると判断可能な基準を明らかにすることにある。本 PS は、バリデーション済みかつ一般に認められた試験法を基準に、これと類似の科学的原則に基づいて、同一の生物学的作用または毒性作用を測定または予測する、他の類似試験法（「模倣的」試験法ともいわれる）の信頼性および正確性を評価するのに用いられる(14)。

2. 改変試験法（すなわち、承認済み試験法に提唱される可能性としての改善点）を用いる前に、提唱される変更が試験の性能に及ぼす影響、およびバリデーション過程の他の部分で利用可能な情報にこの変更が及ぼす影響の範囲について、測定評価すべきである。提唱される変更の数および性質、生成データ、ならびにこの変更を支持する資料により、本試験法は、新規試験に記載されたのと同じバリデーション過程になることを示されるか、あるいは適切である場合には、確立された PS により信頼性および妥当性を限定的に評価されるべきである(14)。

3. 本試験ガイドラインの下で使用が提唱される類似または改変試験法の評価には、LLNA の成績を全て示す化学物質により、その信頼性および正確性を測定すべきである。正当性のない動物の使用を回避するため、モデル開発者は OECD との交渉後、本試験ガイドラインに示された PS および手引きに従って、バリデーション試験を開始することが強く推奨される。

4. 本 PS は、LLNA 類似版または改変版のバリデーション評価のため、PS との調和が得られている米国動物実験代替法検証省庁間連絡委員会（ICCVAM）、欧州代替法バリデーションセンター（ECVAM）、日本動物実験代替法評価センター（JaCVAM）に基づいている(12)。本 PS は、試験法に必須の要素、推奨される参照物質、ならびに提唱される試験法が同等か優れているべき正確性および信頼性の基準からなる。

I. 試験法に必須の要素

5. 類似または改変 LLNA 法が機能的に仕組み上 LLNA と類似しており、同一の生物学的作用を示すよう確保するには、試験法のプロトコルに以下の要素を含めるべきである。

   - 被験物質がマウスの両耳に局所的に適用されること。
   - リンパ球増殖が、被験物質適用部位の流入領域リンパ節で測定されること。

© OECD, (2010)

- リンパ球増殖が、皮膚感作性の誘発時に測定されること。
- 被験物質については、選択する最大投与量が、マウスに全身毒性や過剰な局所皮膚刺激性を引き起こさない最大濃度であること。陽性参照物質については、最大投与量が、対応する参照物質の LLNA EC3 値（表 1 参照）と同程度以上の高さであり、マウスに全身毒性や過剰な局所皮膚刺激性を生じないこと。
- 同時 VC を試験ごとに含め、適切な場合、同時 PC も用いること。
- 投与群あたり最低 4 匹の動物を用いること。
- 個体別またはプールされた動物データのいずれかを収集可能であること。

これらの基準のいずれかが一致しない場合、本 PS を類似または改変試験法のバリデーションに用いることはできない。

II. 参照物質に関する最低限の一覧表

6. PS との調和が得られている米国の ICCVAM、欧州の ECVAM、日本の JaCVAM (12)は、LLNA の PS に含まれる用いるべき最低 18 種類の参照物質、および 4 種類の選択性の参照物質（すなわち、ヒトとモルモットの結果（すなわち TG 406）(13)を比較した場合、LLNA の結果が偽陽性か偽陰性になった物質であるため、LLNA と同等かそれより優れた性能を示す機会となる）を同定した。これらの物質を同定する選択基準は、以下のとおりとした。

    - 参照物質の一覧表には、LLNA による測定または予測が可能であり、皮膚感作性の可能性およびその反応範囲の試験に典型的に用いられるタイプの物質を示した。
    - 明確に定義された化学構造を持つ物質とした。
    - 各物質とも、モルモット試験（すなわち TG 406）(13)由来の LLNA データおよび（可能な場合）ヒト由来データが入手可能なものとした。
    - 参照物質は、市販供給元から容易に入手可能なものとした。

    推奨される参照物質を表 1 に収載する。提唱される参照物質を用いる試験では、表 1 収載の媒体により評価する。収載された物質を入手できない可能性がある場合、上述の選択基準を満たす別の物資を、適切な正当性があれば用いることができる。

© OECD, (2010)

表 1：LLNA の性能標準で推奨される参照物質

番号	物質名[1]	CAS 番号	形状	Veh[2]	EC3 %[3]	N[4]	EC3×0.5 - EC3×2.0	実際の EC3 の範囲	LLNA 対 GP	LLNA 対 ヒト
1	5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン（CMI）／2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン（MI）[5]	26172-55-4/ 2682-20-4	液体	DMF	0.009	1	0.0045-0.018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	固体	AOO	0.049	15	0.025-0.099	0.02-0.094	+/+	+/+
3	4-フェニレンジアミン	106-50-3	固体	AOO	0.11	6	0.055-0.22	0.07-0.16	+/+	+/+
4	塩化コバルト	7646-79-9	固体	DMSO	0.6	2	0.3-1.2	0.4-0.8	+/+	+/+
5	イソオイゲノール	97-54-1	液体	AOO	1.5	47	0.77-3.1	0.5-3.3	+/+	+/+
6	2-メルカプトベンゾチアゾール	149-30-4	固体	DMF	1.7	1	0.85-3.4	NC	+/+	+/+
7	シトラール	5392-40-5	液体	AOO	9.2	6	4.6-18.3	5.1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	液体	AOO	9.7	21	4.8-19.5	4.4-14.7	+/+	+/+
9	オイゲノール	97-53-0	液体	AOO	10.1	11	5.05-20.2	4.9-15	+/+	+/+
10	安息香酸フェニル	93-99-2	固体	AOO	13.6	3	6.8-27.2	1.2-20	+/+	+/+
11	桂皮アルコール	104-54-1	固体	AOO	21	1	10.5-42	NC	+/+	+/+
12	イミダゾリジニル尿素	39236-46-9	固体	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	メタクリル酸メチル	80-62-6	液体	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	クロロベンゼン	108-90-7	液体	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/*
15	イソプロパノール	67-63-0	液体	AOO	50	1	NA	NA	-/-	-/+
16	乳酸	50-21-5	液体	DMSO	25	1	NA	NA	-/-	-/*
17	サリチル酸メチル	119-36-8	液体	AOO	20	9	NA	NA	-/-	-/-
18	サリチル酸	69-72-7	固体	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/-

© OECD, (2010)

番号	物質名[1]	CAS 番号	形状	Veh[2]	EC3 %[3]	N[4]	EC3×0.5 - EC3×2.0	実際の EC3 の範囲	LLNA 対 GP	LLNA 対 ヒト
LLNA に比べ性能の向上を示す選択性の物質										
19	ラウリル硫酸ナトリウム	151-21-3	固体	DMF	8.1	5	4.05-16.2	1.5-17.1	+/-	+/-
20	ジメタクリル酸エチレングリコール	97-90-5	液体	MEK	28	1	14-56	NC	+/-	+/+
21	キシレン	1330-20-7	液体	AOO	95.8	1	47.9-100	NC	+/**	+/-
22	塩化ニッケル	7718-54-9	固体	DMSO	5	2	NA	NA	-/+	-/+

略語 : AOO=アセトン : オリーブ油（4 : 1、v/v）、CAS 番号=ケミカルアブストラクツサービス番号、DMF=*N,N*-ジメチルホルムアミド、DMSO=ジメチルスルホキシド、DNCB=2,4-ジニトロクロロベンゼン、EC3=刺激指数 3 をもたらすのに必要な予測濃度、GP=モルモット試験の結果（すなわち TG 406）(13)、HCA=ヘキシルシンナミックアルデヒド、 Liq=液体、LLNA=マウス局所リンパ節試験の結果（すなわち TG 429）(1)、MEK=メチルエチルケトン、NA=刺激指数 3 未満のため該当せず、NC=1 回の試験から得られたデータのため算出せず、Sol=固体、Veh=試験媒体

[1] 被験物質は、安定性データにより保存の許容性が認められない限り毎日調製すること。

[2] 媒体が異なると LLNA の性能に影響を及ぼす可能性があるため、参照物質ごとに推奨される媒体を用いること(24)(32)。

[3] 2 つ以上の EC3 値を入手可能な場合の平均値。陰性の物質（すなわち刺激指数 3 未満）の場合、実施試験の最大濃度とする。

[4] データが得られた LLNA の数。

[5] 市販品では、CMI と MI の 3 : 1 混合物である Kathon CG（CAS 番号 55965-84-9）が入手可能である。各成分の相対濃度の範囲は 1.1～1.25%（CMI）、0.3～0.45%（MI）である。不活性成分はマグネシウム塩（21.5～24%）、硝酸銅（0.15～0.17%）であり、本製剤の残り 74～77%は水である。Kathon CG はシグマ アルドリッチ、ローム・アンド・ハース（現ダウ・ケミカル・コーポレーション）から容易に入手可能である。

*=臨床パッチテストの結果が認められなかったこと、パッチテストキットのアレルゲンとして含まれていないこと、およびヒト感作性の症例報告書が認められなかったことに基づき、ヒトの感作性物質ではないことが推測される。

**=GP データ入手不能。

© OECD, (2010)

III. 信頼性および正確性の基準の定義

7. 類似または改変 LLNA 法の正確性は、用いるべき最低 18 種類の参照物質により評価された場合、LLNA の PS の正確性と同等かそれより優れていること。新規または改変試験法は、「是か非か」の判断に基づいて正しく分類されるものであること。ただし、新規または改変試験法では、用いるべき最低限の参照物質全ての分類が正しいとは限らない場合がある。例えば、弱い感作性物質の 1 つについて分類を誤った場合、同等の性能を示すには、分類を誤った根拠および適切な追加データ（例えば、分類を誤った参照物質の試験結果に対し、これと類似した物理学的化学的特性および感作特性を有する他の物質により、正しく分類した試験結果を示す）を検討することが考えられる。こうした状況の下で、新規または改変 LLNA 法のバリデーション状態を、そのつど評価することが考えられる。

施設内再現性

8. 施設内再現性を判断するには、新規または改変 LLNA 法について、LLNA において十分に特徴づけられている 1 種類の感作性物質を用いて評価すべきである。よって、LLNA の PS では、ヘキシルシンナミックアルデヒド（HCA）による反復試験から得られた結果のばらつきを基準とする。施設内信頼性を評価するには、HCA 予測濃度の閾値（ECt）を個別に 4 回、試験間隔を 1 週間以上あけて得る。許容可能な施設内再現性は、施設が HCA を用いた試験ごとに 5～20%の範囲で ECt を入手できることにより示される。この HCA 濃度は、LLNA の HCA で特定された EC3 平均値（10%）の 0.5～2.0 倍の範囲であることを示す（表 1 参照）。

施設間再現性

9. 新規または改変 LLNA 法に関する施設間再現性には、LLNA において十分に特徴づけられている 2 種類の感作性物質を用いて評価すべきである。LLNA の PS では、施設別に用いた HCA および 2,4-ジニトロクロロベンゼン（DNCB）の試験結果のばらつきを基準とする。ECt を、3 ヵ所以上の施設で行われた単回試験から個別に入手する。許容可能な施設間再現性を示すには、各施設が HCA 5～20%および DNCB 0.025～0.1%の範囲で ECt を入手する。これらの濃度は、LLNA の HCA、DNCB で特定された EC3 平均値（それぞれ 10%、0.05%）の 0.5～2.0 倍の範囲であることを示す（表 1 参照）。

© OECD, (2010)

補遺 2

定義

正確性：試験法による結果と、一般に認められた参照値との一致の近さ。正確性は試験法の性能の尺度であり、妥当性の一側面にあたる。この用語は、試験法が正しい結果を占める割合を意味する「一致度」の代わりに用いられることが多い(14)。

ベンチマーク物質：被験物質との比較の基準として用いられる感作性または非感作性物質。ベンチマーク物質は以下の特性を有する。(i)供給元に一貫性および信頼性がある。(ii)構造および機能が試験対象物質のクラスに類似している。(iii)物理学的／化学的特性が既知である。(iv)既知の作用に関する裏づけデータがある。(v)効力が既知で望ましい反応範囲にある。

予測濃度の閾値（ECt）：陽性反応の指標である刺激指数をもたらすのに必要な被験物質の予測濃度。

予測濃度 3（EC3）：刺激指数 3 をもたらすのに必要な被験物質の予測濃度。

偽陰性：ある試験法で、被験物質が実際には陽性または活性であるにも関わらず、誤って陰性または非活性と判定されること。

偽陽性：ある試験法で、被験物質が実際には陰性または非活性であるにも関わらず、誤って陽性または活性と判定されること。

有害性：健康または生態系に悪影響を及ぼす可能性のこと。この悪影響は、十分な曝露量がある場合にのみ現れる。

施設間再現性（Inter-laboratory reproducibility）：複数の認定施設が、同一プロトコルを用いて同一被験物質の試験を行った場合、定性的かつ定量的に類似した結果をもたらせる度合いを示す尺度。施設間再現性は、先行バリデーションおよびバリデーション過程中に判定され、ある試験について施設間の技術移転が成功可能な度合いを示す。Between-laboratory reproducibility とも呼ばれる(14)。

施設内再現性（Intra-laboratory reproducibility）：同一施設内の有資格者が、異なる時期に特定のプロトコルを用い、結果の再現に成功可能な度合いを示す判定基準。Within-laboratory reproducibility とも呼ばれる(14)。

© OECD, (2010)

模倣的試験法：バリデーション済みかつ一般に認められた参照試験法と、構造的および機能的に類似した試験法。本試験法は、追走的バリデーションの候補になることが考えられる。類似試験法と言い換えて用いられる(14)。

外れ値：母集団から無作為標本抽出した他の値と顕著に異なる観察結果のこと。

性能標準（PS）：検証済みの試験法に基づき、提唱される試験法が機能的に仕組み上類似している場合、バリデーション済み試験法に匹敵することの評価根拠となる基準。含まれる内容は次のとおりである。(i)試験法に必須の要素。(ii)バリデーション済み試験法で許容可能な性能の立証に用いられる化学物質の中から選択された、最低限の参照物質一覧表。(iii)提唱される試験法が最低限の参照物質一覧表により評価された際、バリデーション済み試験法で得られた結果に基づき立証すべき正確性および信頼性の類似を示す水準(14)。

占有試験法：製造および販売が特許、著作権、登録商標などにより制約される試験法。

品質保証：施設の試験実施基準、要件、および記録管理手順の遵守、ならびにデータ転送の正確性が試験当事者以外の者により評価される管理過程。

参照物質:バリデーション過程で使用するために選択された化学物質であり、*in vitro* または *in vivo* 参照試験系または対象動物種における反応が既知であるもの。参照物質は、試験法での使用が予測される化学物質のクラスを代表するものであり、本物質の使用から予測され得る反応は強弱、陰性まで全ての範囲を示す。バリデーション過程の段階が異なる場合、および試験法や試験用途が異なる場合、異なる一連の参照物質を要することがある(14)。

妥当性：試験と対象になる作用との関係、およびその試験が特定の目的に対し意味を持ち、有用であるか否かの関係を示す用語。試験対象の生物学的作用を、正しく測定または予測する度合いのことである。妥当性は、試験法の正確性（一致度）の検討結果を包含する(14)。

信頼性：同一プロトコルを用いて試験法を実施した場合、施設内および施設間で経時的に再現可能な度合いを示す尺度。信頼性は、施設内および施設間再現性の算出により評価される(14)。

皮膚感作性：感受性のある個体が誘導性化学アレルゲンに局所的に曝露されたときに生じる免疫学的過程であり、皮膚免疫応答が惹起され、接触感作性の発現に至ることがある。

刺激指数（SI）：被験物質の皮膚感作性の可能性を評価するため算出される値であり、投与群の増殖と同時媒体対照群の増殖との比である。

© OECD, (2010)

被験物質：本 TG を用いる試験に供される材料であり、単一の化合物であるか、複数の成分（例えば最終製品、製剤）からなる。製剤の試験の場合、規制当局によっては最終製品である製剤の試験のみ要求することを考慮すべきである。ただし、製剤の活性成分が試験の要求事項になることもある。

バリデーション済み試験法：バリデーション試験について、特定の目的に対する妥当性（正確性を含む）および信頼性の判定が既に完了している試験法。バリデーション済み試験法は、提唱される目的が許容可能であることを示す正確性および信頼性の点では、十分な性能があるとはいえないことに留意されたい(14)。

© OECD, (2010)