OECD/OCDE

2010/07/22

試験ガイドライン No.442B

局所リンパ節試験:BrdU-ELISA または -FCM

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 (2010), Test No. 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or –FCM, 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-442B-2010.pdf.

©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

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

皮膚感作性：局所リンパ節試験：BrdU-ELISA

はじめに

1. 化学物質の試験に関する OECD ガイドラインは、科学的進歩および規制要件の変化を踏まえるとともに、動物愛護に配慮して定期的に再検討されている。マウスを用いた皮膚感作性試験、すなわち局所リンパ節試験（LLNA、TG 429）に関する最初の試験ガイドライン（TG）は 2002 年に採択され、それ以来改訂が行われてきた(1)。LLNA のバリデーションの詳細とそれに関連する論評が公表されている(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)。LLNA では、放射性同位元素標識チミジンまたはヨウ素を用いてリンパ球の増殖を測定することから、放射性物質の取得、使用または処分が問題となる場所では使用が制限される。LLNA：BrdU-ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）は、放射性物質を使用しない LLNA の改良法であり、ELISA 法に基づく試験系で非放射能標識 5-ブロモ-2-デオキシウリジン（BrdU）（CAS 番号 59-14-3）を用いることによりリンパ球の増殖を測定する。LLNA：BrdU-ELISA 法は、独立の国際ピアレビュー委員会により検証および検討が行われ、皮膚感作物質および非感作物質の判定に有用であると推奨されているが、一定の限界がある(10)(11)(12)。本試験ガイドラインは、動物を用いて化学物質の皮膚感作能を評価するために立案された。TG 406 では、モルモットを用いた試験法、特にモルモットマキシマイゼーション法（Guinea Pig Maximisation Test）およびビューラー法（Buehler Test）が用いられる(13)。LLNA（TG 429）ならびに 2 種の非放射性修正法、すなわち LLNA：BrdU-ELISA（TG 442 B）および LLNA：DA（TG 442 A）のいずれも、動物の使用数を減らすことができ、使用方法も改善されるという点で TG 406 (13)のモルモット法より優れている。

2. LLNA：BrdU-ELISA 法（以下、本法と記す）は、LLNA と同様に、皮膚感作の誘導相を調べるものであり、この手法を用いれば用量反応性の評価に使用できる定量的データが得られる。さらに、皮膚感作物質を検出する際に DNA 用の放射能標識体を必要としないために、職業性放射能暴露の可能性および廃棄物処分問題がなくなる。この試験法では皮膚感作物質試験用のマウスの使用が増えることもまた念頭に入れておく必要があるが、皮膚感作性試験（つまり TG 406）用のモルモットの使用数はなお一層減ると思われる(13)。

定義

3. 用語の定義を補遺 1 に示す。

最初に考慮すべき事項および限界

4. 本法は、被験物質の皮膚感作性を判定するための LLNA の修正法であるが、一定の限界がある。すべての事例で LLNA またはモルモット試験（すなわち TG 406）(13)の代わりに本法の使用が求められるというわけではなく、むしろ本法には同等の利点があり、結果が陽性であっても陰性であってもそれ以上の確認試験は必要としない代替法として使用できるものと考えられる(10)(11)。試験機関には、試験実施前に被験物質に関する利用可能なすべての情報を考慮することが求められる。その情報は、被験物質の同一性および化学構造、物理化学的性質、被験物質に関するほかの *in vitro* または *in vivo* 毒性試験の結果、ならびに構造的関連物質の毒性学的データなどである。本法が被験物質に適しているどうか（被験物質によっては本法に不適合なものがある

© OECD（2010 年）
出典が適切に示されている限り、本文書の非営利目的での個人的使用は自由であり、OECD による事前の承諾を必要としない。本文書を営利目的で使用する場合には、OECD の文書による許可を必要とする。

という限界を考慮に入れて（段落 5 を参照））を判断し、用量設定を容易にするためにこの情報を使用する。

5. 本法は *in vivo* 試験法であるため、アレルギー性接触感作活性の評価に動物を使用せざるを得ないが、モルモット試験（TG 406）(13)に比べて評価用の使用動物数を減らすことはできる。また本法では、TG 406 とは異なり、抗原再投与による皮膚過敏反応の惹起を必要としないため、アレルギー性接触感作活性評価試験における動物の使用方法を大幅に改善できる。さらに、本法では、モルモットマキシマイゼーション法(13)で用いられるアジュバントを使用する必要がない。したがって、本法では動物の苦痛が軽減される。本法には TG 406 (13)を上回る利点があるにもかかわらず、（ある種の金属の試験、ある種の皮膚刺激性物質（一部の界面活性剤など）では偽陽性の結果が得られること(6)(1)、被験物質の溶解度などの）限界があるため、TG 406 を実施せざるを得ない場合がある。さらに、被験物質のクラスによっては、または交絡因子(15)として作用する官能基を含む物質では、モルモット試験 (TG 406 (13)) の実施が必要になるかもしれない。LLNA(1)で確認されている限界は本法(10)にも適用される。本法は、確認されている上記のような限界のほかに、本法の正確性を損なうおそれのない物質に限り適用できる。さらに刺激指数（SI）が 1.6～1.9 の場合には、境界域陽性である可能性を考慮に入れる（段落 31～32 を参照）。これは 43 種の物質に関するバリデーションデータベースに基づいており、SI 値が 1.6 以上（段落 6 を参照）という基準を用いて行われた本法のバリデーションにおいて LLNA 感作物質 32 種の判定がすべて正確であったのに対して SI 値 1.6～1.9 の LLNA 非感作物質 11 種のうち 2 種の判定が不正確（すなわち、境界域陽性）であった(10)ためである。しかし、SI 値の設定と予測特性の算出に同じデータセットが使用されたため、その判断は真の予測特性に対して過大評価であるかもしれない。

試験の概要

6. 本法は、感作物質が被験物質適用部位の所属リンパ節においてリンパ球の増殖を誘導するという基本原理に基づいている。この増殖は、用量と適用アレルゲンの効力に比例しており、それにより感作能を簡単に定量測定できる。増殖は、各被験物質適用群の平均増殖を媒体処置対照（VC）群の平均増殖と比較することにより求められる。SI と呼ばれる、各被験物質群の平均増殖の同時 VC 群の平均増殖に対する比を求め、それが 1.6 以上である場合には、被験物質に皮膚感作性の疑いがあるとしてさらに評価を行う。この文書で説明する方法は、BrdU 含量を測定すると耳介所属リンパ節における増殖細胞数の増加が分かるという原理に基づいている。BrdU はチミジンのアナログであり、同じように増殖細胞の DNA に取り込まれる。BrdU の取り込み量は、ペルオキシダーゼ標識された BrdU 特異的抗体を用いた ELISA で測定する。基質を添加するとペルオキシダーゼは基質と反応して、呈色物質を生成する。マイクロタイタープレートリーダーを用いて特定波長の吸光度を測定することにより濃度を求める。

試験方法

動物種の選択

7. 本法に最適の動物種はマウスである。本法のバリデーション試験で用いられたのは CBA/JN 系統のみであったため、この系統が優先的に選択すべき系統とみなされる(10)(12)。未経産で非妊娠の若齢成熟雌マウスを用いる。試験開始時の週齢は 8～12 週齢で、体重の変動は最小限とし平均体重から 20%の範囲を超えないようにする。LLNA：BrdU-ELISA 応答に有意な系統差および

／または性差がないことを示す十分なデータがあれば、代わりにほかの系統および雄を使用してさしつかえない。

飼育および給餌条件

8. 個体別の飼育を支持する適切な科学的根拠がある場合を除いて、マウスは群飼いとする(16)。動物飼育室の温度は 22 ± 3°C とする。相対湿度は目標値を 50～60%とし、30%以上で 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。飲料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、適用開始前に 5 日間以上それぞれのケージで飼育して飼育室環境に馴化させる。適用開始に先立って、皮膚に肉眼的に識別できる傷がないことをすべての動物で確認する。

投与液の調製

10. 固形の被験物質は溶媒／媒体に溶解するかまたは懸濁させ、マウス耳介への適用前に必要に応じて希釈する。液状の被験物質はそのままかまたは希釈して適用する。医療機器で一般にみられるような不溶性の物質は、マウス耳介への適用前に適当な溶媒で完全に抽出して、溶出するおそれのあるすべての成分を試験できるようにする。被験物質溶液は、保存安定性を示すデータがない限り用時調製する。

信頼性のチェック

11. 陽性対照（PC）を用いて、応答強度既知の感作物質に対する感度が十分であり、かつ再現性があることを証明し、測定法の性能が適切であることを示す。同時 PC 試験を行うと、試験機関に測定を毎回適切に実施する能力があることを証明でき、実験室内および室間再現性ならびに同等性の評価が可能になることから、これを試験に加えることを推奨する。試験ごとに PC の試験を行うよう要求する規制当局もあるので、本法の実施前に所管の規制当局に相談した方がよい。したがって、そのような規制要件を満たすための追加的な動物試験が不要になるように同時 PC 試験を日常的に行うことを薦める。定期的 PC 試験で済ます場合には、追加的な動物試験が要求されることもある（段落 12 を参照）。PC では、陰性対照（NC）群に対して SI 値の 1.6 以上の増加が予想される暴露量において LLNA：BrdU-ELISA 応答が陽性でなければならない。PC の用量は、過度な皮膚刺激も全身毒性も起こさず、誘導に再現性が保たれるとともに過度ではないように選択する（たとえば、14 を超える SI 値は過度と考えられる）。推奨 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）および 25%オイゲノール（CAS 番号 97-53-0）であり、どちらも媒体はアセトン：オリーブ油（4：1、v/v）である。十分妥当な理由があり、上記の基準に適合する場合に限り、ほかの PC 物質を使用することもできる。

12. 同時 PC 群を置くことを推奨するが、試験機関によっては PC 物質の定期的試験（つまり、6 カ月以内の間隔で）で十分な場合もある。ただし、そのような試験機関は、本法を規則的に実施（つまり、1 カ月に 1 回ほどの頻度で本法を実施）し、PC の背景データベースを確立して、試験機関に再現性のある正確な PC 試験の結果を得る能力があることを証明しなければならない。

© OECD（2010 年）

PC の試験を妥当な期間内（1 年未満）に独立して 10 回以上行い、そこで陽性結果が一貫して得られれば、本法についての熟練度が証明されたことになる。

13. 本法の操作上の変更（熟練職員の変更、試験法の材料および／または試薬の変更、試験機器の変更、供試動物の供給元の変更など）がある場合には、必ず同時 PC 群を試験に加えるとともに変更事項を実験報告書に記載する。そのような変更が、先に確立された背景データベースの妥当性を損なうものであるかどうかを考察して、PC 試験結果の一貫性を証明するために新たな背景データベースを確立する必要性があるかどうかを決定する。

14. PC 試験を同時ではなく定期的に行う場合には、定期的な試験の合間に同時 PC 試験のない条件で陰性の試験結果が得られても、その妥当性と受容性についてはさまざまな問題が派生することに留意しなければならない。たとえば、定期的な PC 試験で偽陰性の結果が得られた場合には、採用された最後の定期的 PC 試験と不採用の定期的 PC 試験の合間で被験物質について陰性であったとしても信頼性はないといってさしつかえない。同時 PC 試験を行うべきか定期的 PC 試験だけにすべきかを決定するときには、それらの帰結の意味を慎重に考察する。また、同時 PC 群の使用動物数を減らすことが科学的に正当と考えられ、試験機関が施設独自の背景データに基づいてマウス使用数を減らせることを証明できるなら、そのことも考慮する(17)。

15. PC 物質は一貫した応答を示す媒体（アセトン：オリーブ油（4：1、v/v）など）に溶解して使用するが、ある種の規制条件下では、非標準的な媒体（臨床的／化学的に適切な調製物）に溶解して使用することが必要になる場合もある(18)。同時 PC 物質を被験物質用の媒体とは異なる媒体に溶解して使用する場合には、同時 PC に対応する別の VC を試験に加える。

16. 属する化学クラスおよび応答範囲が特殊な被験物質を評価する際に試験法の皮膚感作性検出機能が正しく機能していることを証明するには、ベンチマーク物質も有用であることがある。適切なベンチマーク物質には以下の性質が必要である。

- 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
- 本法で得られた裏づけデータがあること
- 動物モデルおよび／またはヒトから得られた裏づけデータがあること

試験手順

動物数および用量

17. 各用量群で最低 4 匹の動物、被験物質当たり最低 3 濃度に加えて、被験物質用の媒体のみで処置する同時 NC 群および PC 群（段落 11～15 で考察した試験機関の方針に基づいて同時または直近の）を設ける。PC 試験を間欠的に行う場合には特別に多重用量で行う。対照群動物は、被験物質を用いないことを除いては被験物質処置群動物と同じ方法で取り扱い、かつ処置する。

18. 用量設定と媒体の選定は参考文献 2 および 19 で示されている推奨に従う。通常、100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%などの適切な濃度系列から連続的な用量を選択する。使用する濃度系列の選択には適切な化学的根拠が必要である。利用可能な場合は、既存の毒性学的情報（急性毒性および皮膚刺激性など）、ならびに目的とする被験物質（および／または構造

的に関連する物質）についての構造および物理化学的情報を考慮に入れ、最高濃度において全身毒性および／または過度な皮膚刺激を生じない範囲で暴露量が最大になるような連続する 3 段階の濃度を設定する(19)(20)。そのような情報がない場合には初期の予備スクリーニングが必要なこともある（段落 21～24 を参照）。

19. 媒体は、試験結果に悪影響や偏りをもたらすものではなく、被験物質の適用に適した溶液／懸濁液を調製できる範囲で濃度を最大限まで上げることができるように溶解度が最大になるものを選ぶ。推奨する媒体はアセトン：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(6)であるが、十分な科学的根拠があればほかの媒体も使用できる。ある種の状況下では追加的な対照として、臨床的に適切な溶媒、または被験物質の販売時に溶解に用いられる市販用調製物を用いる必要があるかもしれない。親水性物質は適切な可溶化剤（1% Pluronic® L92 など）を用いて媒体系に混合し、試験液が皮膚を湿らせてすぐには流れ出さないように特に注意を払う必要がある。そのため、完全に水性の媒体は避ける。

20. 個々のマウスからリンパ節を採取して処理する場合には、動物間のばらつきを評価し、被験物質群と VC 群の測定値の差を統計学的に比較することを念頭に入れておく（段落 33 を参照）。それに加えて、PC 群のマウスの数を減らせるかどうかを検討するのがふさわしいのは動物の個体別データを収集する場合だけである(17)。さらに、国によっては個体別動物データの収集を求める規制当局もある。個々の動物のデータを規則的に集めると、試験の重複を避けることができ、動物愛護の役に立つ。ただし、規制当局が、当初はある方法（たとえば、全体を合わせたデータ（pooled animal data）を用いて）でまとめられた結果を、あとで別の要件（個体別データなど）に基づいて検討する場合には、試験の重複が避けられないかもしれない

予備スクリーニング

21. 最高試験用量（段落 18 を参照）を決定するための情報がない場合には、予備スクリーニングを行い、本法の適切な用量を求める。予備スクリーニングの目的は、全身毒性（段落 24 を参照）および／または過度な皮膚刺激反応（段落 23 を参照）が誘導される濃度についての情報が入手できない場合に、主試験で使用する最大限の用量を設定するための手引を用意することである。最大限の用量は液体の被験物質では 100%、固体または懸濁液では調製可能な最高濃度である。

22. リンパ節の細胞増殖に関する所見がない場合を除いて主試験と同じ条件で予備スクリーニングを実施する。その場合には群当たりの動物数を減らすことができる。各群 1 または 2 匹を使用する。マウス全例について全身の毒性徴候、または適用部位の局所刺激反応を毎日観察する。体重測定は、試験前および屠殺前（6 日目）に行う。各マウスの両耳を観察して紅斑の状態を表 1 に基づいて採点する(20)。耳介の厚みを、1 日目（適用前）、3 日目（初回適用の約 48 時間後）、および 6 日目に、厚さ計（デジタル式マイクロメータまたは Peacock Dial 厚さ計など）を用いて測定する。さらに 6 日目には、動物を安楽死させたあとで耳パンチ重量測定法により耳介厚みを測定することもできる。どの測定日であっても紅斑スコアが 3 以上および／または耳介厚みが 25%以上増加した場合には過度の刺激反応とみなす(21)(22)。主試験で設定される最高用量は、予備スクリーニングの濃度系列（段落 18 を参照）で全身毒性または過度の局所皮膚刺激反応を誘発しない用量から 1 段階低い用量とする。

© OECD（2010 年）

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（ビート様の色）から紅斑の採点ができないほどの痂皮形成	4

23. LLNA では、耳介厚みが 25%増加した場合に加えて(21)(22)、耳介厚みが対照群マウスに比べて統計学的有意に増加した場合にも刺激性物質と判定されてきた(22)(23)(24)(25)(26)(27)(28)。しかし、耳介厚みが統計学的有意に増加しても 25%未満の場合には、過度の刺激反応との明確な関連は認められなかった(25)(26)(27)(28)(29)。

24. 以下の一般状態の観察所見は、完全な毒性評価の一部として用いる場合には全身毒性(30)を示すものであり、したがって、主試験で使用すべき最高用量を示すものと考えられる。すなわち、神経系機能の変化（立毛、運動失調、振戦、および痙攣など）、行動変化（攻撃的行動、身づくろい活動の変化、活動量の変化など）、呼吸パターンの変化（すなわち呼吸困難、喘ぎ呼吸、およびラッセル音などの呼吸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である。さらに、嗜眠および／または無反応の徴候、軽微を上回る徴候、または一時的疼痛および苦痛、または 1 日目から 6 日目までの間での 5%を上回る体重減少、ならびに死亡の有無を評価する。瀕死状態の動物または重度の疼痛および苦痛の徴候がみられる動物は安楽死させる(31)。

主試験スケジュール

25. 試験の実施スケジュールは以下のとおりである。

- *1 日目：*

  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。それぞれの耳の背部に、被験物質の適切な希釈液、媒体のみ、または PC（段落 11～15 で考察した試験機関の方針に従って、同時または直近の）の各 25 μL を適用する。

- *2 および 3 日目：*

  1 日目に実施した適用操作を繰り返す。

- *4 日目：*

  無処置。

- *5 日目：*

  BrdU（10 mg/mL）溶液 0.5 mL（5 mg/匹）を腹腔内投与する。

- *6日目：*

  各動物の体重および一般状態を記録する。BrdU 注入から約 24 時間（24 h）後に動物を安楽死させる。各マウスの耳から耳介所属リンパ節を摘出し、動物ごとに別々にリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に浸漬する。リンパ節の識別および解剖の詳細な説明と図は参考文献(17)を参照のこと。主試験で局所皮膚反応を綿密に調べるために、耳介部紅斑の採点または耳介厚み測定（厚み計または剖検時に耳パンチ重量測定法で測定）などの追加的なパラメータをプロトコールに記載することもできる。

細胞懸濁液の調製

26. リンパ節細胞（LNC）の単細胞懸濁液は、各マウスの両耳から採取したリンパ節から、200 μm メッシュのステンレス製ガーゼを通過させる穏やかな機械的解離法、または条件に合った別の単細胞懸濁液調製技術（使い捨てのプラスチック製乳棒でリンパ節を粉砕したあと、#70 ナイロン製メッシュを通す方法など）により調製する。LNC 懸濁液を調製する操作はこの試験法の決定的な段階であるため、どの作業者もあらかじめ熟練しておくことが求められる。さらに、NC 動物のリンパ節は小さいため、SI 値に人為的な影響が及ばないように注意深く操作することが重要である。例ごとに、LNC 懸濁液の目標容量を所定の最適容量（約 15 mL）に調節する。最適容量は、NC 群の平均吸光度が 0.1～0.2 になるように決定する。

細胞増殖の測定（リンパ球 DNA 中 BrdU 含量の測定）

27. BrdU は市販の ELISA キット（たとえば、Roche Applied Science（マンハイム、ドイツ）、カタログ番号 11 647 229 001）で測定する。簡単にいうと、LNC 懸濁液 100 μL を平底のマイクロプレートのウェルに添加（1 試料につき 3 ウェルを使用）する。LNC を固定し、変性させたあとで抗 BrdU 抗体を各ウェルに添加して反応させる。次いで洗浄により抗 BrdU 抗体を除去したあと、基質溶液を添加して色素原を生成させる。その後、検出波長 370 nm および対照波長 492 nm で測定する。どのような場合でも、試験条件を最適化する（段落 26 を参照）。

観察

一般状態の観察

28. マウスは、毎日 1 回以上、個体別に注意深く観察し、適用部位の局所刺激反応または全身の毒性徴候を調べる。観察結果はすべて系統的に記録し、個体別に記録を保存する。モニタリング計画には、全身毒性、過度の局所刺激反応、または皮膚の腐食が現れたマウスを即座に見つけ、安楽死させるかどうか決定するための基準を記載する(31)。

体重

29. 段落 25 で述べたように、動物の体重は個体別に試験開始時および計画屠殺時に測定する。

結果の計算

© OECD（2010 年）

30. 結果を処置群ごとに平均 SI として表わす。SI 値は、各被験物質群および PC 群におけるマウス 1 匹当たりの平均 BrdU 標識指数を溶媒／VC 群の平均 BrdU 標識指数で除して求める。したがって、VC 群の平均 SI は 1 である。

BrdU 標識指数は次のように定義される。

$$\text{BrdU 標識指数} = (ABS_{em} - \text{ABS blank}_{em}) - (ABS_{ref} - \text{ABS blank}_{ref})$$

なお、em は検出波長、ref は対照波長を示す。

31. SI が 1.6 以上の場合に陽性とみなす(10)が、境界域の結果（つまり、SI 値が 1.6～1.9）が陽性であるかどうかを判定する場合には、用量反応関係の強さ、統計学的有意性、ならびに溶媒／媒体および PC 応答の一貫性も参考にする(3)(6)(32)。

32. SI 値が 1.6～1.9 の境界域陽性応答が陽性であることを確認するために、用量反応関係、全身毒性徴候、過度の刺激反応、該当する場合には SI 値とともに統計学的有意性などの追加的情報を検討することが望まれることもある(10)。既知の皮膚感作物質と構造的に関連性があるかどうか、マウスで過度の皮膚刺激反応を起こすかどうか、さらに観察された用量反応性の特性はどのようなものかなどの被験物質のさまざまな性質について検討すること。このような事項についてはほかの所で詳細に考察されている(4)。

33. マウスのデータを個体別に収集すると、データに用量反応関係があるかどうか、またその程度について統計学的に解析することが可能になる。統計学的評価では、どのような場合でも、適切に調整した方法（被験物質群対同時溶媒／媒体対照群の対比較など）で試験群間の比較を行うだけではなく用量反応関係の評価を行うこともできる。統計解析では、用量反応関係を評価するための直線回帰または Williams 検定、および対比較のための Dunnett 検定などを行う。適切な統計解析法を選ぶ場合には、分散の不均一性があり得ること、またそれ以外でデータ変換またはノンパラメトリック統計解析を必要とする統計上の問題が起こる可能性があることに留意する。どのような場合でも、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の両方で SI 値の計算と統計解析を行う。

データおよび報告

データ

34. データは総括表にまとめ、個体別の BrdU 標識指数、1 匹当たりの群平均 BrdU 標識指数、関連する誤差項目（SD、SEM など）、および同時溶媒／媒体対照群に対する各被験物質群の平均 SI を示す。

試験報告書

35. 試験報告書には以下の情報を記載する。

被験物質および対照物質：

- 同一性を示すデータ（CAS 番号（入手可能な場合）、供給元、純度、既知の不純物、ロット番号など）
- 物理的性質および物理化学的性質（揮発性、安定性、溶解性など）
- 調製物であれば組成および成分の相対的百分率

溶媒／媒体：

- 同一性を示すデータ（純度、濃度（該当する場合）、使用容量）
- 選択の理由

供試動物：

- CBA マウスの由来
- 情報がある場合には動物の微生物学的状態
- 動物数および週齢
- 動物の供給元、飼育条件、飼料など

試験条件：

- ELISA キットの供給元、ロット番号、製造者の品質保証／品質管理データ（抗体の感度、特異性および検出限界）
- 被験物質溶液の調製および適用の詳細
- 用量設定の根拠（予備スクリーニングを実施した場合はその結果を含む）
- 媒体および被験物質の使用濃度、ならびに被験物質の総適用量
- 飼料および水の質の詳細（飼料の種類／供給元、水の供給元を含む）
- 処置およびサンプリングのスケジュールの詳細
- 毒性評価方法
- 陽性または陰性の判定基準
- プロトコールからの逸脱、および逸脱が試験デザインと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
- 試験機関における同時および／または背景 PC ならびに同時陰性（溶媒／媒体）対照データ
- 同時 PC を置かない場合には、直近の定期的 PC の日付および実験報告書、ならびに試験機関が同時 PC を置か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：

- 適用開始時および計画屠殺時の個体別体重、ならびに処置群ごとの平均値および関連誤差項目（SD、SEM など）
- 適用部位の皮膚刺激反応（もしあれば個体別）などの毒性の発現と徴候の経過
- 処置群ごとに個体別の BrdU 標識指数および SI 値を記載した表
- 処置群ごとの 1 匹当たりの BrdU 標識指数の平均値および関連誤差項目（SD、SEM など）、ならびに処置群ごとの外れ値解析の結果
- 算出 SI 値、および被験物質群と対照群の双方で個体間のばらつきを評価するための適切な尺度
- 用量反応関係
- 該当する場合には統計解析

結果の考察：

© OECD（2010 年）

－ 被験物質が皮膚感作物質であるか否かという結論に関係する結果、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) OECD (2010), *Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.

(3) 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.

(4) 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.

(5) 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 sensitizing 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.

(6) 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 Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) 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(3), 258-273.

(8) 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(3), 274-286.

(9) 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(3), 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm]

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle

© OECD（2010 年）

Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf]

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitizing potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.,* 25, 129-134.

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

(14) 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.

(15) 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.

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

(17) 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]

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

(19) 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.

(20) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(21) 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. *Toxicologis*t, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive 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].

(23) 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.

(24) 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.

(25) 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.

(26) 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.

(27) 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.

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

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

(30) 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].

(31) 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]

(32) 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 sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ.l Health*, 53, 563-79.

(33) 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]

© OECD（2010 年）

補遺 1

正確度：試験法による結果が、一般的に認められた参照値にどの程度一致するかを示す近似性の指標。試験法の性能の尺度であり、妥当性の一側面である。この用語は、多くの場合、試験法の正確な転帰の割合を意味する「一致性」の代わりに用いられる(33)。

ベンチマーク物質：被験物質との比較に標準として用いられる感作または非感作物質。ベンチマーク物質には以下の性質が必要である。すなわち、(i) 供給元に一貫性および信頼性があること、（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こと、（iii）物理学／化学的特性が既知であること、（iv）既知の作用に関する裏づけデータがあること、（v）効力が既知で望ましい範囲にあること。

偽陰性：ある試験法で、被験物質が実際は陽性または活性であるにもかかわらず、誤って陰性または非活性と判定されること(33)。

偽陽性：ある試験法で、被験物質が実際は陰性または非活性であるにもかかわらず、誤って陽性または活性と判定されること(33)。

危険有害性：健康または生態系に悪影響を及ぼす性質。有害な影響は、十分な暴露量がある場合にのみ現れる。

実験室間再現性（Inter-laboratory reproducibility）：異なる適合試験機関が同じプロトコールを用いて同じ物質を試験したとき、定性的かつ定量的にどの程度類似した結果が得られるかを示す尺度。実験室間再現性は、プレバリデーションおよびバリデーションで評価される。試験法を施設間で移転したときの再現性の程度を示し、Between-laboratory reproducibility とも呼ばれる(33)。

実験室内再現性（Intra-laboratory reproducibility）：同じ試験機関の有資格者が特定のプロトコールを用いて異なる時期に試験を繰り返したとき、どの程度再現性の良好な結果が得られるかを示す尺度。Within-laboratory reproducibility とも呼ばれる(33)。

外れ値：ある集団の任意の試料でみられる、ほかの値と著しく異なる値。

信頼性保証：試験機関の試験標準、遵守事項、および記録保管手順書への準拠状況、ならびにデータ移転の正確性を評価する管理活動であり、試験関係者から独立した者により行われる。

信頼度：同じプロトコールを用いて試験法を実施したときに得られる経時的な実験室内および室間再現性の程度を表わす尺度。実験室内および室間再現精度の算出により評価される(33)。

皮膚感作：感受性のある個体が誘導性化学的アレルゲンに局所的に暴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、その結果、接触感作性の発現に至る。

刺激指数（SI）：同時媒体対照群の増殖に対する被験物質群の増殖の比を計算して求める、被験物質の皮膚感作能を評価するための値。

被験物質: この試験ガイドラインに準拠する試験に供される物質であり、単一の化合物の場合と、多成分（最終製品、調製物など）から成る場合がある。調製物を試験する場合には、最終製剤の試験のみを要求する規制当局もあるということを考慮する必要がある。しかし、製剤の有効成分の試験が要求されることもある。

© OECD（2010 年）