OECD/OCDE

2018/06/25

# 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 (2018), 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/publications/reports/2024/10/replaced-and-deleted-test-guidelines-2024/TG-442B-local-lymph-node-assay-2018.pdf.

©OECD (2018)

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

# OECD/OCDE 442B

採択：
2018 年 6 月 25 日

*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*

## 局所リンパ節試験:BRDU-ELISA または BRDU-FCM

### 概要

1. 皮膚感作性物質とは、国連勧告「化学品の分類および表示に関する世界調和システム」（UN GHS）(1)に定義されている通り、皮膚との反復接触後にアレルギー反応を引き起こす物質のことをいう。

2. 皮膚感作性の原因となる主要な生物学的事象に関しては、広く意見が一致している。タンパク質との共有結合に始まる皮膚感作性に伴う化学的、生物学的機序に関する現在の知識は、有害性発現経路（Adverse Outcome Pathway: AOP）(2)の形式で要約される。これは、分子レベルの初期事象に始まり、中間の重要事象を経て、アレルギー性接触皮膚炎である有害作用に至る。この AOP では、有機化学物質など、チオール（すなわちシステイン）および第一級アミン（すなわちリジン）と反応する化学物質に注目している。この場合、分子レベルの初期事象（1 つ目の重要事象）は、皮膚タンパク質の求核中心と求電子性物質との共有結合である。1 つ目の重要事象には、in chemico ペプチド結合性試験（Direct Peptide Reactivity Assay [DPRA]；TG 442C）(3)を用いる。本 AOP における 2 つ目の重要事象は角化細胞に起こり、炎症性反応や特異的細胞シグナル伝達経路による遺伝子発現の変化からなる。このようなものに、抗酸化剤／求電子物質応答配列（antioxidant/electrophile response element: ARE）依存性経路がある。この重要事象には、in vitro ARE-Nrf2 ルシフェラーゼ試験法(KeratinoSensTM or LuSens) TG 442D (4)を用いる。3 つ目の重要事象は樹状細胞（DC）活性化であり、通常は特異的な細胞表面マーカーであるケモカインおよびサイトカインの発現により評価される。これには、TG 442E (5)に記載したように、in vitro ヒト細胞株活性化試験(h-CLAT)、in vitro U937 細胞株活性化試験（U-SENS™）またはインターロイキン-8 レポーター遺伝子アッセイ（IL-8 Luc アッセイ）を用いる。4 つ目の重要事象は、T 細胞増殖であり、in vivo マウス局所リンパ節試験（LLNA）(6)で間接的に測定する。

3. 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に関する最初の試験ガイドライン（TG）（LLNA、TG 429）は 2002 年に採択され、それ以来改訂が行われてきた(7)。LLNA のバリデーションの詳細とそれに関連するレビューが公表されている(8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16)。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。

**© OECD, (2018)**

本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/に掲載されている諸条件に従って自由に使用することができる。

化学物質の評価におけるデータの相互受け入れに関する委員会決定付属書 I を修正する権限委譲に対する委員会決定に準拠し[C(2018)49]、本ガイドラインは、2018 年 6 月 25 日に化学委員会と化学物質、殺虫剤およびバイオテクノロジーに関する作業部会との OECD 合同会議で手順書に従って修正された。

4. 本試験ガイドラインに、放射性物質を使用しない 2 種類の LLNA の改良法を記載する。これは、ELISA 法（酵素結合免疫吸着検定法）または FCM（フローサイトメトリー法）に基づく試験系であり、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。

- 局所リンパ節試験:BrdU-ELISA (付録 IA)
- 局所リンパ節試験:BrdU-FCM (付録 IB)

5. LLNA：BrdU-ELISA 法および LLNA:BrdU-FCM 法は、LLNA と同様に、皮膚感作の誘導相を調べるものであり、ここに挙げた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のに放射能標識 DNA を必要としないために、職業性放射能曝露の可能性や廃棄物処分の問題がなくなる。この試験法では皮膚感作物質を検出するためのマウスの使用が増える可能性があるが、皮膚感作性試験（TG 406） (17)用のモルモットの使用数はもっと減ると思われる。

6. 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(17)。LLNA（TG 429）(7)ならびに非放射性修正法、すなわち LLNA：BrdU-ELISA（TG 442 B）および LLNA：DA（TG 442 A）(18)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 のモルモット法(17)より優れている。

## 参考文献


1) UN, 2017. Globally Harmonised Sysem of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) Seventh revised edition. United Nations, New York. Available at: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html

2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Available at: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

3) OECD (2015), In Chemico Skin Sensitisation, Test Guideline No. 442C, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

4) OECD (2015), In Vitro Skin Sensitisation, Test Guideline No. 442D, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

5) OECD (2017), In Vitro Skin Sensitisation, Test Guideline No. 442E, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

6) OECD (2010), The Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 429, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/testguidelines

7) 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]


© OECD 2018

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

9) 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.

10) 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.

11) 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.

12) 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]

13) 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.

14) 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.

15) 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.

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

17) OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442A.Skin sensitization: Local Lymph Node assay: DA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

18) 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 2018

## 補遺 I - 定義

**正確性：**試験法による結果が、許容されている参照値にどの程度一致するかを示す近似性の指標。試験法の性能を判断する尺度であり、妥当性の一側面である。 この用語は、多くの場合、試験法の正確な結果の割合を意味する「一致性」と同義的に用いられる(12)。

**AOP（有害性発現経路）：**分子レベルの初期事象から検討対象の in vivo 転帰まで、標的化学物質または一群の類似化学物質の化学構造から生じる一連の事象(2)。

**ベンチマーク化学物質：**被験化学物質との比較に標準として用いられる感作物質または非感作物質。ベンチマーク化学物質は以下の性質を備えている必要がある：すなわち、(i)供給元が同じであり、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)強度が既知で望ましい範囲にあること。

**偽陰性：**ある試験法で、被験化学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(12)。偽陰性率は試験法の性能を表す指標の 1 つである。

**偽陽性：**ある試験法で、被験化学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(12)。偽陽性率は試験法の性能を表す指標の 1 つである。

**ハザード（有害性）：**生物、生物系または（下位）生物集団がある物質に曝露した場合に悪影響を引き起こす可能性がある物質固有の性質または状態のこと。

**実験室間再現性：**異なる適合試験機関が同じプロトコルを用いて同じ化学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(12)。

**実験室内再現性：**同じ試験機関の有資格者が特定のプロトコ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(12)。

**混合物：**互いに反応しない 2 つ以上の物質からなる混合物または溶液。

**単一成分物質：**定量的組成に、1 主要成分が 80%（w/w）以上存在することにより定義される物質。

**多成分物質**：定量的組成に、2 つ以上の主要成分が濃度 10%（w/w）以上 80%（w/w）未満存在することにより定義される物質。多成分物質は、製造工程の結果生じる。混合物と多成分物質との違いは、混合物の場合、化学反応なしに 2 種類以上の物質を混合して得られるのに対し、多成分物質は化学反応の結果得られることにある。

© OECD 2018

**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。

**性能標準**：バリデーション済み試験法に基づいた基準。提案された試験法のうち、構造的・機能的に類似したものについて、その同等性を評価する際の根拠となる。性能標準には、(i)試験法の不可欠な要素、(ii)バリデーション済み試験法において、許容される性能を示すのに使用される化学品の中から選抜された参照物質の最小限のリスト、(iii)参照物質の最小限のリストを用いて評価する際に、提案された試験法が示す必要があるバリデーション済み試験法について得られたものと同等レベルの正確性と信頼性が含まれる(12)。

**習熟度確認化学物質（物質）：**性能標準に含まれる参照物質のうち、標準化された試験法での実施に必要な技術的能力を実証するために実験室で使用される物質。このような物質の選定基準としては、通常、一群の反応を代表する物質であること、市販されていること、高品質の参照値が利用できることが挙げられる。

**品質保証:**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。

**参照化学物質（物質）:**新試験法が、バリデート済みの参照試験法によって実証される許容基準を満たす能力を示すのに用いられる一群の化学物質。参照物質は、その試験法で使用することが予想される化学物質のクラスを代表するものであり、使用した場合には、幅広い反応（強いものから弱い反応までと陰性の反応）が得られることが予想されるものでなければならない。

**妥当性：**試験とそれによって生じる影響との関係と、試験が特定の目的にとって意義や有用性があるかを示す。試験が試験対象となる生物学的影響を正確に測定または予測できる程度を示す。妥当性は、試験法の正確性（一致度）を含む(12)。

**信頼性：**同じプロトコ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実験室間再現性の程度を表す尺度。実験室内および実験室間再現性ならびに実験室内の繰り返し精度を算出して評価する(12)。

**再現性**：同じ試験手順を用いて同じ物質について試験を実施した場合に得られる結果が一致していること（信頼性参照）(12)。

**受信者動作特性（Receiver Operating Characteristics[ROC]）：**予測モデルの最適カットオフ値を設定するための解析。カットオフ値を用いた予測モデルにより、被験化学物質を陽性または陰性に分類することができる。カットオフ値を変えると、感度と特異度が逆の方向に変化する。診断検査の至適カットオフ値を得るために、ROC 解析がよく用いられる。

© OECD 2018

**感度：**試験法により正しく分類される陽性/活性の化学物質すべての割合。分類結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する際の重要な検討事項である(12)。

**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、その結果、接触感作性の発現に至る。

**特異度：**試験法により正しく分類される陰性/不活性の化学物質すべての割合。分類結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する際の重要な検討事項である(12)。

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

**物質**：自然の状態の、または製造過程で得られる化学元素とその化合物のことをいい、その製品の安定性を保つために必要な添加物や、その使用工程から派生する不純物は含まれるが、その物質の安定性に影響を及ぼすことも、その組成を変化させることもなく分離する可能性のある溶媒は除く(1)。

**被験化学物質：**「被験化学物質」という用語は、試験対象をいう場合に用いる。被験物質が単一成分物質、多成分物質、および／または混合物であるかは本試験法への適用を規定するものではない。

**UVCB：**組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生体物質。

© OECD 2018

# OECD/OCDE 442B

採択：
2018 年 6 月 25 日

## 付録 IA：In vivo 皮膚感作性:局所リンパ節試験:BrdU-ELISA

## 最初に考慮すべき事項、適用および限界

1. 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(1) (2) (3)。

2. LLNA:BrdU-ELISA 法は、被験化学物質の皮膚感作性を判定するための LLNA の放射性物質を使用しない修正法であるが、一定の限界がある。In vivo 法の使用が必要と考えられる場合に、考えられるすべての事例で放射性 LLNA 試験（TG 429）またはモルモット試験（TG 406）(4)の代わりに LLNA:BrdU-ELISA 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を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(1) (2)。試験機関には、試験実施前に被験化学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。このような情報には、被験化学物質の特定名および化学構造、物理化学的性質、被験化学物質に関するほかの in vitro または in vivo での毒性試験の結果、ならびに構造的関連化学物質の毒性学的データなどがある。LLNA:BrdU-ELISA が被験化学物質に適しているどうか（被験化学物質によっては LLNA:BrdU-ELISA に不適合なものがあるため[段落 3 参照]）を判断し、用量設定に役立てるために、この情報を使用する。

3. LLNA:BrdU-ELISA 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。したがって、適切な in vitro、in chemico および in silico 法の適用領域と、動物での試験ではなく in vitro、in chemico や in silico アプローチを用いる可能性を考慮すべきである。ただし、ほかの LLNA 試験法と同じく、LLNA:BrdU-ELISA はモルモット試験（TG 406）(4)に比べて評価用の使用動物数を減らすことができる。また LLNA:BrdU-ELISA 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、LLNA:BrdU-ELISA は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、LLNA:BrdU-ELISA では、モルモットマキシマイゼーション法で用いられるアジュバントを使用する必要がない(4)。したがって、LLNA:BrdU-ELISA では動物の苦痛が軽減される。LLNA:BrdU-ELISA には TG 406 (4)を上回る利点があるにもかかわらず、いくつか限界があるため（ある種の金属の試験、一部の界面活性剤などの皮膚刺激性物質では偽陽性の結果が得られること(5) (6)、被験化学物質の溶解度[難溶性物質や不溶性物質など]）、TG 406 を実施せざるを得ない場合がある。さらに、交絡因子として作用する官能基を含む被験化学物質クラスや被験化学物質（脂肪酸グルタミン酸塩、オレイン酸、オレイン酸エステル、脂肪族第 1 級アルコール、脂肪族第 2 級アルコール、ポリアミノ官能性シロキサン(7)など）では、モルモット試験（TG 406）(4)の実施が必要になることがある。LLNA (6)で確認されているこのほかの限界を LLNA:BrdU-ELISA にも適用することが推奨される(1)。確認されている上記のような限界以外に、LLNA:BrdU-ELISA の正確性を損なうおそれのな

© OECD, (2018)

本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/に掲載されている諸条件に従って自由に使用することができる。

化学物質の評価におけるデータの相互受け入れに関する委員会決定付属書 I を修正する権限委譲に対する委員会決定に準拠し[C(2018)49]、本ガイドラインは、2018 年 6 月 25 日に化学委員会と化学物質、殺虫剤およびバイオテクノロジーに関する作業部会との OECD 合同会議で手順書に従って修正された。

い物質に限って、LLNA:BrdU-ELISA を適用する。さらに、LLNA:BrdU-ELISA で刺激指数（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必要がある（段落 31～32 を参照）。これは、SI 値が 1.6 以上（段落 6 を参照）という基準を用いた 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いる。これによると、LLNA:BrdU-ELISA は LLNA 感作物質 32 種の判定がすべて正確であったが、LLNA 非感作物質 11 種のうち、SI 値 1.6～1.9（境界域陽性）であった 2 種の判定が誤っていた(1)。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。

4. 混合物、試験困難化合物（不安定など）や、本ガイドラインに記載されている適用領域に収まることが明確でない被験物質の試験を検討する場合、そのような試験で科学的に意味のある結果が生じるかどうかを事前に考慮する必要がある。

5. 定義を「概要」の補遺 1 に示す。

## 試験の原理

6. LLNA:BrdU-ELISA は、感作物質が被験化学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強度に比例しており、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溶媒対照（VC）群の平均増殖と比較することによって評価することができる。各被験物質群の平均増殖について、同時 VC 群の平均増殖に対する比（SI と呼ばれる）を求め、それが 1.6 以上である場合には、被験化学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定量する。

## 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。LLNA:BrdU-ELISA のバリデーション試験に用いたのは CBA/JN 系統のみであったため、この系統を優先的に選択すべき系統と考える(1) (3)。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や雄を使用してさしつかえない。

© OECD 2018

*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、マウスは群飼いとし(8)、適した材料でできた平底ケージ(9)と床敷きを使用する(10) (11) (12) (13)。動物飼育室の温度は 22 ± 3ºC 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るとよい。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、人道的に個体識別ができるようにマークし（非侵襲的な毛刈りを用いることが望ましい）(14) (15)、適用開始前に 5 日間以上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。試験中は常に、cupping や tunnel handling などの非嫌悪法を用いてマウスを扱う(16)。

*投与液の調製*

10. 固形の被験化学物質は溶媒/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。液状の被験化学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化学物質(35)は、マウス耳介への適用前に適当な溶媒で苛酷抽出して、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。被験化学物質溶液は、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、応答強度が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、LLNA:BrdU-ELISA の実施前に所管の規制当局に相談した方がよい。上記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 試験を採用していると必要になる場合があるため）（段落 12 を参照）。PC では、VC 群に 1.6 以上の SI 値を生じることが予想される曝露量で、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 化学物質は 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、どちらも溶媒はアセトン：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は、ほかの PC 化学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 化学物質の定期的試験（6 カ月以内の間隔）で十分な場合もある。ただし、そのような試験機関

© OECD 2018

は、LLNA:BrdU-ELISA を定期的に実施（1 カ月に 1 回以上の頻度で LLNA:BrdU-ELISA 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。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、LLNA:BrdU-ELISA についての十分な習熟が証明されたことになる。

13. LLNA:BrdU-ELISA の操作上の変更（熟練職員の変更、試験材料および/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 試験結果の一致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、受容可能な最後の定期的 PC 試験と受容できない定期的 PC 試験との間に得た陰性の被験化学物質の結果に疑問が生じる。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、その結果の意味を慎重に考察する必要がある。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場合は、使用動物数を減らすことを検討する(17)。

15. PC 化学物質は一貫した応答を示す溶媒（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、規制条件によっては、標準的でない溶媒（臨床的/化学的に適切な製剤）で試験することが必要になる場合もある(18)。同時 PC 化学物質を被験化学物質用の溶媒とは異なる溶媒に溶解して使用する場合には、同時 PC に別の VC を組入れる必要がある。

16. 化学クラスまたは応答範囲が特殊な被験化学物質を評価する際には、このような被験化学物質の皮膚感作性の検出について、試験法が正しく機能していることを証明するのに、ベンチマーク化学物質も有用である。適切なベンチマーク化学物質には以下の性質を備えている必要がある。

- 対象とする被験化学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:BrdU-ELISA で得られた裏づけデータがあること
- その他の動物モデルおよび/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. 用量群あたり動物 4 匹以上、被験化学物質あたり最低 3 種類の濃度を使用する。このほかに、被験化学物質用の溶媒のみで処置する同時 VC 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に実施するもの）を

© OECD 2018

設ける。PC 試験を時々しか実施しない場合は、多種類の用量を検討する必要がある。対照群動物は、被験化学物質を用いないことを除いて被験物質処置群の動物と同じ方法で取り扱い、処置する。

18. 用量設定と溶媒の選定は参考文献 2 および 27 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する 3 段階の用量を選択する。使用する濃度系列の選択には十分な科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）、目的とする被験化学物質（および/または構造的に関連する化学物質）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曝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. 溶媒は、試験結果に悪影響や偏りをもたらすものではなく、被験化学物質の適用に適した溶液/懸濁液を調製する際に最高濃度を達成できるよう、溶解度を最大にするものを選ぶ。推奨する溶媒はアセトン：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(5)であるが、十分な科学的根拠があればほかの溶媒も使用できる。場合によっては、臨床的に適切な溶媒や、被験化学物質の販売時に溶解に用いられる市販製剤を対照に追加する必要がある。親水性物質は適切な可溶化剤（1% Pluronic® L92 など）を用いて溶媒系に混合し、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、完全に水性の溶媒は避ける。

20. 個々のマウスからリンパ節を採取して処理することにより、動物間のばらつきの評価と、被験物質群と VC 群の測定値の差の統計学的比較が可能になる（段落 33 を参照）。また、PC 群のマウスの数を減らせるかどうかの検討は、個々の動物のデータを収集する場合にのみ可能となる(18)。さらに、規制当局が個々の動物のデータの収集を求める国もある。普段から個々の動物のデータを収集することが、動物福祉に役立つ。これは具体的には、ある種の方法（併合動物データなど）で初めに収集した被験化学物質の結果がのちに規制当局によって別の要件（個々の動物データ）の対象になると必要になる試験の反復をなくすことができるからである。

### *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、LLNA:BrdU-ELISA 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/または過度な局所皮膚刺激反応（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高用量を設定するための指針を得ることにある。検討する最高用量は、液体の被験化学物質では 100%、固体または懸濁液では調製可能な最高濃度である。

© OECD 2018

22. リンパ節の細胞増殖に関して評価しないことと、用量群あたりの動物数が少なくてよいことを除いて、主試験と同じ条件で予備スクリーニングを実施する。用量群あたり 1 または 2 匹を使用する。全身毒性の臨床徴候や適用部位の局所刺激反応がないか、マウス全例を毎日観察する。体重測定を、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がないか観察し、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。このほか、6 日目に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ができる。いずれかの測定日の紅斑スコアが 3 以上および/または耳介厚みが 25%以上増加した場合に過度の刺激反応とみなす(21) (22)。主試験に設定する最高用量は、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。

**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（ビート様赤色）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(21) (22)した場合のほか、被験群の耳介厚みが溶媒/媒体対照群マウスより統計学的に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に有意に増加しても、25%未満の場合には、過度の刺激反応との明確な関連はなかった(25) (26) (27) (28) (29)。

24. 以下の一般状態は、統合評価の一部として用いる場合には全身毒性を示すものであり(30)、したがって、主試験で使用すべき最高用量である。これは具体的には、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、活動量の著しい変化など）、呼吸パターンの変化（呼吸困難、喘ぎ呼吸およびラ音などの呼吸数や呼吸強度の変化）、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、軽微または一時的なものを超える疼痛および苦痛を示す何らかの臨床徴候、1 日目から 6 日目にかけての 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通りである。

© OECD 2018

- 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、被験化学物質の適切な希釈液、溶媒のみ、PC（段落 11～15 で考察した試験機関の方針に従って、同時または直近に実施するもの）それぞれ 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:

  処置なし。

- 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。リンパ節の特定および解剖の詳細な説明と図は参考文献を参照のこと(17)。主試験の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の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ルに記載してもよい。

### *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にきわめて重要であるため、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、VC 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。いずれの場合も、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、VC 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（バリデーション試験には Roche Applied Science、ドイツ、マンハイムを使用）で測定する。同じ結果が得られるのであれば、他の BrdU ELISA キットを使用してもよい。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 3 連で添加する。LNC を固定し、変性させたあとでペルオキシダーゼ標識抗 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 で吸光度を測定する。いずれの場合も、試験条件を最適化する（段落 26 を参照）。

© OECD 2018

## 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速やかに見つけ、安楽死させるかどうか決定するための基準が記載されていなければならない(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

30. 結果を処置群ごとに平均 SI として表す。SI 値は、各被験化学物質群および PC 群におけるマウスあたり平均 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。

31. BrdU 標識指数は次のように定義される。

32. BrdU 標識指数 = (ABSem − ABS blankem) – (ABSref − ABS blankref)

33. なお、em は検出波長、ref は対照波長を示す。

34. SI が 1.6 以上の場合に陽性と判断する(1)。ただし、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 応答の一致も参考にする(5) (32) (33)。

35. SI 値が 1.6〜1.9 の境界域陽性応答の場合、このような結果が陽性であると確定するため、SI 値のほかに、用量反応関係、全身毒性徴候、過度の刺激反応、該当する場合には統計学的有意性などの追加情報を検討するとよい(1)。既知の皮膚感作物質と構造的に関連性があるかどうか、マウスに過度の皮膚刺激反応を起こすかどうか、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化学物質のさまざまな性質についても検討すること。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(34)。

36. 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。いかなる統計学的評価にも、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なく、用量反応関係の評価を組み込むとよい。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

© OECD 2018

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*

37. 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（SD、SEM など）、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*

38. 試験報告書には以下の情報を記載する。

### *被験化学物質*

- 供給元、ロット番号、入手可能である場合は使用期限
- わかっている場合、被験化学物質の安定性

### *単一成分物質*

- 物理的外観、水溶性、そのほかのしかるべき物理化学的特性
- IUPAC 名または CAS 名、CAS 番号、SMILES 記法または InChI コード、構造式、純度、場合により実質的な不純物の化学的特定名などの化学物質識別情報

### *多成分物質、UVCB、混合物*

- 成分の化学的特定名（上記参照）、含有量および関連のある物理化学的性質によるできる限りの成分の特性決定

### *対照*

- 識別データ（入手可能な場合は CAS 番号、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、溶解度など）

### *溶媒/媒体*

- 識別データ（純度、該当する場合は濃度、使用容量）
- 溶媒選択の妥当性

### *供試動物*

- CBA マウスの供給元
- 情報がある場合には動物の微生物学的状態

© OECD 2018

- 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）
- 被験化学物質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）
- 溶媒および被験化学物質の使用濃度、ならびに被験化学物質の総適用量
- 飼料および水質の詳細（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

*信頼性のチェック*

- 使用した被験化学物質、濃度、PC、VC と、場合によっては使用するベンチマーク化学物質の情報を含む、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 VC 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マウス個体別体重、ならびに処置群ごとの平均値および関連誤差項（SD、SEM など）
- もしあれば、適用部位の個体別の皮膚刺激反応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
- 処置群ごとのマウスあたり BrdU 標識指数の平均値および関連誤差項（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 値のほか、被験化学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しかるべき尺度
- 用量反応関係
- 該当する場合には統計解析

© OECD 2018

*結果の考察：*

- 結果、用量反応解析および該当する場合は統計解析に関する短評と、被験化学物質が皮膚感作物質であるか否かという結論

## 参考文献

(1) 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]

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

(3) 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.

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

(5) 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]

(6) 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]

(7) 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.

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

(9) National Research Council. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington, D.C

(10) Olsson A, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. Lab Animals 2002;36:243- 270

(11) Van Loo PLP, Kruitwagenb CLJJ, Koolhaasc JM, Van de Weerdd HA, Van Zutphena LFM, Baumans V. Influence of cage enrichment on aggressive behaviour and

© OECD 2018

physiological parameters in male mice. Applied Animal Behaviour Science. 2002;76(1):65-81

(12) Würbel H. Ideal homes?: housing effects on rodent brain and behavior. Trends in Neuroscience. 2001;24:207-211

(13) Würbel H, Garner JP. Refinement of rodent research through environmental enrichment and systematic randomization. NC3Rs. Published January 2007. https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Refinementenvironmentalenrichmentandsystematicrandomization.pdf. Accessed April 06, 2018

(14) Dahlborn K, Bugnon P, Nevalainen T, Raspa M, Verbost P and Spangenberg E. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification. Laboratory Animals. 2013;47:2-11.

(15) Norecopa. Toe Clipping: Evaluation and Alternatives. https://norecopa.no/media/6470/norecopa-toeclip.pdf, Published 2008. Accessed 9 April 2018.

(16) Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. Nature Methods. 2010;7:825-826

(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. Toxicologist, 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.

© OECD 2018

(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) 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.

(33) 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.

(34) 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.

(35) ISO 10993-12:2012 Biological evaluation of medical devices Part 12: Sample preparation and reference materials.

© OECD 2018

## 付録 IB：In vivo 皮膚感作性:局所リンパ節試験:BrdU-FCM

### 最初に考慮すべき事項、適用および限界

1. LNA:BrdU-FCM 法は、独立の国際ピアレビューに従って検証が行われ、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(1) (2) (3) (4)。LLNA:BrdU-FCM のバリデーション試験が、OECD の化学物質の試験に関するガイドライン補遺 1、皮膚感作性：局所リンパ節試験(TG 429)の皮膚感作性に提案されている類似 LLNA 試験法または修正 LLNA 試験法の評価に関する性能標準（PS）に準拠して実施されている。

2. LLNA:BrdU-FCM は、被験化学物質の皮膚感作性を判定するための LLNA の非放射性修正法であるが、一定の限界がある。In vivo 法の使用が必要と考えられる場合に、考えられるすべての事例で放射性 LLNA 試験（TG 429）またはモルモット試験（TG 406）(5)の代わりに LLNA:BrdU-FCM 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を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(1) (2)。試験機関には、試験実施前に被験化学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。このような情報には、被験化学物質の特定名および化学構造、物理化学的性質、被験化学物質に関するほかの in vitro または in vivo での毒性試験の結果、ならびに構造的関連化学物質の毒性学的データなどがある。LLNA:BrdU-FCM が被験物質に適しているどうか（被験物質によっては LLNA:BrdU-FCM に不適合なものがあるという限界を考慮に入れて[段落 3 参照]）を判断し、用量設定に役立てるために、この情報を使用する。

3. LLNA:BrdU-ELISA 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。したがって、適切な *in vitro*、*in chemico*、および *in silico* 法の適用領域と、動物での試験ではなくこのようなアプローチを用いる可能性を考慮すべきである。ただし、ほかの LLNA 試験法と同じく、LLNA:BrdU-FCM はモルモット試験（TG 406）(5)に比べて評価用の使用動物数を減らすことができる。また LLNA:BrdU-FCM 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、LLNA:BrdU-FCM は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、LLNA:BrdU-FCM では、モルモットマキシマイゼーション法で用いられるアジュバントを使用する必要がない(5)。したがって、LLNA:BrdU-FCM では動物の苦痛が軽減される。LLNA:BrdU-FCM には TG 406 (5)を上回る利点があるにもかかわらず、いくつか限界があるため（ある種の金属の試験、一部の界面活性剤などの皮膚刺激性物質では偽陽性の結果が得られること(6) (7)、被験化学物質の溶解度[難溶性物質や不溶性物質など]）、TG 406 を実施せざるを得ない場合がある。さらに、交絡因子として作用する官能基を含む被験化学物質クラスや被験化学物質（脂肪酸グルタミン酸、オレイン酸、オレイン酸エステル、脂肪族第 1 級アルコール、脂肪族第 2 級アルコール、ポリアミノ官能性シロキサン(8)など）では、モルモット試験（TG 406）(5)の実施が必要になることがある。LLNA (7)で確認されているこのほかの限界を

© OECD 2018

LLNA:BrdU-FCM にも適用することが推奨される(1)。確認されている上記のような限界のほかに、LLNA:BrdU-FCM の正確性を損なうおそれのない物質に限って、LLNA:BrdU-FCM を適用する。バリデーション試験によると、LLNA:BrdU-FCM は、LLNA の結果に基づき、TG 429 PS に記載された 22 の参照物質のうち 20 を正確に特定した(1)。中等度皮膚感作性物質の 1 つである 2-メルカプトベンゾチアゾールと、弱い皮膚感作性物質の 1 つであるメタクリル酸メチル（LLNA の残りの修正法では予測に限界がある）は、LLNA:BrdU-FCM で誤って分類された(1) (2) (9)。しかし、刺激指数（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。

4. 規制上の目的を意図したデータ生成の場合、混合物について本試験ガイドラインを用いる前に、当該混合物がその目的に十分な結果を提示できるか否か、また提示できる場合にはその理由を検討する。そのような混合物の試験に関する規制要件がある場合、こうした検討は不要である。

5. 定義を「概要」の補遺 1 に示す。

## 試験の原理

6. LLNA:BrdU-FCM は、感作物質が被験化学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強度に比例しており、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溶媒対照（VC）群の平均増殖と比較することによって評価することができる。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 2.7 以上である場合には、被験化学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、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）で標識された BrdU 特異的抗体を用いた FCM で測定する。FCM は、リンパ球集団の分析に広く用いられているフローサイトメータを用いて BrdU 陽性生存細胞数を定量する。

## 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。LLNA:BrdU-FCM のバリデーション試験に用いたのは BALB/c 系統のみであったため、この系統を優先的に選択すべき系統と考える(1) (2)。CBA/J 系統も、LLNA:BrdU-FCM に使用可能である。CBA/J 系統の応答は BALB/c 系統の応答と高度に相関しており、感度がさらに高い(2) (10) (11) (12)。しかし、受信者動作特性（ROC）解析で感度を最大にするためには、各系統に対して異なるカットオフ SI 値を採用する必要があると思われる。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-FCM 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

© OECD 2018

りにほかの系統や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、マウスは群飼いとし(13)、適した材料でできた平底ケージ(34)と床敷きを使用する(35) (36) (37) (38)。動物飼育室の温度は 22 ± 3ºC 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るとよい。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、人道的に個体識別ができるようにマークし（非侵襲的な毛刈りを用いることが望ましい）(39) (40)、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。試験中は常に、cupping や tunnel handling などの非嫌悪法を用いてマウスを扱う(41)。

### *投与液の調製*

10. 固形の被験化学物質は溶媒/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。液状の被験化学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化学物質(33)は、マウス耳介への適用前に適当な溶媒で苛酷抽出して、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。被験化学物質溶液は、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、応答強度が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、LLNA:BrdU-FCM の実施前に所管の規制当局に相談した方がよい。上記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 試験を採用していると必要になる場合があるため）（段落 12 を参照）。PC では、VC 群に対して 2.7 以上の SI 値を生じることが予想される曝露量で、LLNA:BrdU-FCM 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、27 を超える SI 値は過度と考えられる）。推奨 PC 化学物質は 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、どちらも溶媒はアセトン：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

© OECD 2018

合する場合は、ほかの PC 化学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 化学物質の定期的試験（6 カ月以内の間隔）で十分な場合もある。ただし、そのような試験機関は、LLNA:BrdU-FCM を定期的に実施（1 カ月に 1 回ほどの頻度で LLNA:BrdU-FCM 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。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、LLNA:BrdU-FCM についての十分な習熟が証明されたことになる。

13. LLNA:BrdU-FCM 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 試験結果の一致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、受容可能な最後の定期的 PC 試験と受容できない定期的 PC 試験との間に得た陰性の被験化学物質の結果に疑問が生じる。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、その結果の意味を慎重に考察する必要がある。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場合は、使用動物数を減らすことを検討する(14)。

15. PC 化学物質は一貫した応答を示す溶媒（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、規制条件によっては、標準的でない溶媒（臨床的/化学的に適切な製剤）で試験することが必要になる場合もある(15)。同時 PC 化学物質を被験化学物質用の溶媒とは異なる溶媒に溶解して使用する場合には、同時 PC に別の VC を組入れる必要がある。

16. 化学クラスまたは応答範囲が特殊な被験化学物質を評価する際には、このような被験化学物質の皮膚感作性の検出について、試験法が正しく機能していることを証明するのに、ベンチマーク化学物質も有用である。適切なベンチマーク化学物質には以下の性質を備えている必要がある。

- 対象とする被験化学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:BrdU-FCM で得られた裏づけデータがあること
- その他の動物モデルおよび/またはヒトから得られた裏づけデータがあること

© OECD 2018

試験手順

### *動物数および用量*

17. 用量群あたり動物 4 匹以上、被験化学物質あたり最低 3 種類の濃度を使用する。このほかに、被験化学物質用の溶媒のみで処置する同時 VC 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に実施するもの）を設ける。PC 試験を時々しか実施しない場合は、多種類の用量を検討する必要がある。対照群動物は、被験化学物質を用いないことを除いて被験物質処置群の動物と同じ方法で取り扱い、処置する。

18. 用量設定と溶媒の選定は参考文献 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する 3 段階の用量を選択する。使用する濃度系列の選択には十分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）、目的とする被験化学物質（および/または構造的に関連する化学物質）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曝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(16) (17)。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. 溶媒は、試験結果に悪影響や偏りをもたらすものではなく、被験化学物質の適用に適した溶液/懸濁液を調製する際に最高濃度を達成できるよう、溶解度を最大にするものを選ぶ。推奨する溶媒はアセトン：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溶媒も使用できる。場合によっては、臨床的に適切な溶媒や、被験化学物質の販売時に溶解に用いられる市販製剤を対照に追加する必要がある。親水性物質は適切な可溶化剤（1% Pluronic® L92 など）を用いて溶媒系に混合し、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、完全に水性の溶媒は避ける。

20. 個々のマウスからリンパ節を採取して処理することにより、動物間のばらつきの評価と、被験物質群と VC 群の測定値の差の統計学的比較が可能になる（段落 33 を参照）。また、PC 群のマウスの数を減らせるかどうかの検討は、個々の動物のデータを収集する場合にのみ可能となる(14)。さらに、規制当局が個々の動物のデータの収集を求める国もある。普段から個々の動物のデータを収集することが、動物福祉に役立つ。これは具体的には、ある種の方法（併合動物データなど）で初めに収集した被験化学物質の結果がのちに規制当局によって別の要件（個々の動物データ）の対象になると必要になる試験の反復をなくすことができるからである。

### *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、LLNA:BrdU-FCM 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/または過度な局所皮膚刺激反応（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

© OECD 2018

験で使用する最高用量を設定するための指針を得ることにある。検討する最高用量は、液体の被験化学物質では 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して評価しないことと、用量群あたりの動物数が少なくてよいことを除いて、主試験と同じ条件で予備スクリーニングを実施する。用量群あたり 1 または 2 匹を使用する。全身毒性の臨床徴候や適用部位の局所刺激反応がないか、マウス全例を毎日観察する。体重測定を、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がないか観察し、表 1 に基づいて採点する(17)。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。このほか、6 日目に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ができる。いずれかの測定日の紅斑スコアが 3 以上および/または耳介厚みが 25%以上増加した場合に過度の刺激反応とみなす(18) (19)。主試験に設定する最高用量は、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。

**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（ビート様赤色）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(18) (19)した場合のほか、被験群の耳介厚みが溶媒/媒体対照群マウスより統計学的に有意に増加した場合にも刺激性物質と判定されてきた(19) (20) (21) (22) (23) (24) (25)。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、過度の刺激反応との明確な関連はなかった(22) (23) (24) (25) (26)。

24. 以下の一般状態は、統合評価の一部として用いる場合には全身毒性を示すものであり(27)、したがって、主試験で使用すべき最高用量である。これは具体的には、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、活動量の著しい変化など）、呼吸パターンの変化（呼吸困難、喘ぎ呼吸およびラ音などの呼吸数や呼吸強度の変化）、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、軽微または一時的なものを超える疼痛および苦痛を示す何らかの臨床徴候、1 日目から 6 日目にかけての 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(28)。

© OECD 2018

*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通りである。

- 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、被験化学物質の適切な希釈液、溶媒のみ、PC（段落 11～15 で考察した試験機関の方針に従って、同時または直近に実施するもの）それぞれ 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:
  - 処置なし。
- 5 日目:
  - BrdU（20 mg/mL）溶液 0.1 mL（2 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。リンパ節の特定および解剖の詳細な説明と図は参考文献を参照のこと(14)。主試験の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の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ルに記載してもよい。

*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にきわめて重要であるため、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、VC 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。LNC は適量の冷 PBS（例:2 mL）を用いて採取し、必要に応じて LNC 懸濁液を希釈してよい（例:10 倍希釈）。LNC の数を数える。次のステップには $1.5 \times 10^6$ LNC が必要である。

© OECD 2018

### *細胞増殖の測定（BrdU 陽性リンパ球の測定）*

27. BrdU 陽性リンパ球を、市販のキットを用いて FCM により測定する（バリデーション試験には、BD Pharmingen、米国、ニュージャージー州 Franklin Lakes を使用）。同じ結果が得られるのであれば、他の抗 BrdU 抗体キットを使用してもよい。簡潔に述べると、LNC 懸濁液（$1.5 \times 10^6$）を、遠心分離により PBS で 1 回洗浄したあと再懸濁する。キットに同梱された緩衝液で細胞を透過処理したあと、DNase で処理する。洗浄後、FITC 標識抗 BrdU 抗体を添加し、さらに洗浄後、7-アミノアクチノマイシン D（7-AAD）溶液を添加する。7-AAD 発現生存細胞集団（$10^4$ 細胞）内の BrdU 陽性細胞数をフローサイトメータにより計数する。

## 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速やかに見つけ、安楽死させるかどうか決定するための基準が記載されていなければならない(28)。

### *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

30. 結果を処置群ごとに平均 SI として表す。LLNA:BrdU-FCM の SI は、被験化学物質群または PC 群のマウスあたり BrdU 陽性 LNC の数を、溶媒/VC 群における BrdU 陽性 LNC の平均数で除して算出する。したがって、VC 群の平均 SI は 1 である。

BrdU 陽性 LNC 数を以下のように定義する（付録 IB-補遺 1 パラグラフ 7 を参照）:BrdU 陽性 LNC 数=BrdU 陽性細胞の割合（Q2%[1]）×LNC 数

31. SI が 2.7 以上の場合に陽性と判断する(1) (2) (10)。ただし、境界域の結果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 応答の一致も参考にする(6) (29) (30)。

32. 得た結果を解明する必要がある場合は、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化学物質のさまざまな性質に

[1] フローサイトメータ解析における「Quadrant Statistics」のゲート百分率データ（Q2 領域%）。

© OECD 2018

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(31)。

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。いかなる統計学的評価にも、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なく、用量反応関係の評価を組み込むとよい。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 陽性 LNC 数、BrdU 標識指数、1 匹当たりの群平均 BrdU 陽性 LNC 数や、関連する誤差項（SD、SEM など）、同時溶媒/媒体対照群に対する各用量群の平均 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。

### *被験化学物質：*

- 供給元、ロット番号、入手可能である場合は使用期限
- わかっている場合、被験化学物質の安定性

### *単一成分物質*

- 物理的外観、水溶性、そのほかのしかるべき物理化学的特性
- IUPAC 名または CAS 名、CAS 番号、SMILES 記法または InChI コード、構造式、純度、場合により実質的な不純物の化学的特定名などの化学物質識別情報

### *多成分物質、UVCB、混合物*

- 成分の化学的特定名（上記参照）、含有量および関連のある物理化学的性質によるできる限りの成分の特性決定

### *対照*

- 識別データ（入手可能な場合は CAS 番号、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、溶解度など）

© OECD 2018

*溶媒/媒体：*

- 識別データ（純度、該当する場合は濃度、使用容量）
- 溶媒選択の妥当性

*供試動物*

- BALB/c マウスまたは CBA マウスの供給元
- 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*

- FCM 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）
- 被験化学物質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）
- 溶媒および被験化学物質の使用濃度、ならびに被験化学物質の総適用量
- 飼料および水質の詳細（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：*

- 使用した被験化学物質、濃度、PC、VC と、場合によっては使用するベンチマーク化学物質の情報を含む、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 VC 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マウス個体別体重、ならびに処置群ごとの平均値および関連誤差項（SD、SEM など）
- もしあれば、適用部位の個体別の皮膚刺激反応などの毒性の発現と徴候の経過

© OECD 2018

- 処置群ごとに個体別の BrdU 陽性 LNC および SI 値を記載した表
- 処置群ごとのマウスあたり BrdU 陽性 LNC 数の平均値および関連誤差項（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 値のほか、被験化学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しかるべき尺度
- 用量反応関係
- 該当する場合には統計解析

*結果の考察：*

- 結果、用量反応解析および該当する場合は統計解析に関する短評と、被験化学物質が皮膚感作物質であるか否かという結論

## 参考文献

(1) OECD (2018), Local Lymph Node Assay: 5-bromo-2-deoxyuridine-flow cytometry method (LLNA: BrdU-FCM) Validation Study Report, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 283, ENV/JM/MONO(2018)43, OECD, Paris.

(2) OECD (2018), Summary of the Peer Review of the Validation Study for LLNA: BrdU-FCM Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No.284, ENV/JM/MONO(2018)44, OECD, Paris.

(3) Yang H, Na J, Jang WH, Jung MS, Jeon JY, Heo Y, Yeo KW, Jo JH, Lim KM, Bae SJ. (2015), Appraisal of within- and between-laboratory reproducibility of non-radioisotopic local lymph node assay using flow cytometry, LLNA: BrdU-FCM: Comparison of OECD TG429 performance standard and statistical evaluation. Toxicology Letters 234: 172-179.

(4) Ahn IY, Kim TS, Jung ES, Yi JS, Jang WH, Jung KM, Park MY, Jung MS, Jeon EY, Yeo KY, Jo JH, Park JE, Kim CY, Park YC, Seong WK, Lee AY, Chun YJ, Jeong TC, Jeung EB, Lim KM, Bae SJ, Sohn SJ, Heo Y. (2016), Performance standards based validation study for Local Lymph Node Assay: 5-Bromo-2-Deoxyuridine-flow cytometry method. Regul. Toxicol. Pharmacol. 80:183-194.

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

(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]

© OECD 2018

(7) 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]

(8) 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.

(9) Kolle SN, Basketter DA, Casati S, Stokes WS, Strickland J, Ravenzwaay BV, Vohr HW, Landsiedel R 2013. Performance standards and alternative assays: Practical insights from skin sensitization. Regulatory Toxicology and Pharmacology 65: 278-285

(10) Lee YS, Yi JS, Seo SJ, Kim JH, Jung MS, Seo IK, Ahn IY, Ko KY, Kim TS, Lim KM, Sohn SJ. (2017), Comparison of BALB/c and CBA/J mice for the local lymph node assay using bromodeoxyuridine with flow cytometry (LLNA: BrdU-FCM). Regul. Toxicol. Pharmacol. 33:13-22.

(11) Ha SJ, Ahn IY, Kim DE, Lee JK, Sohn SJ, Jung MS, Heo Y, Omori T, Bae SJ, Lim KM. (2017) Evaluation of radioisotopic and non-radioisotopic versions of local lymph node assays for subcategorization of skin sensitizers compliant to UN GHS rev 4. Regul. Toxicol. Pharmacol. 85:124-131.

(12) Maeda, Y., Hirosaki, H., Yakata, N., Takeyoshi, M. (2016), Comparison of outcomes obtained in murine local lymph node assays using CBA/J or CBA/Ca mice. J. Appl. Toxicol. 36:1011-4.

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

(14) 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]

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

(16) 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.

(17) 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]

(18) 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.

(19) 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].

© OECD 2018

(20) 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.

(21) 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.

(22) 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.

(23) 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.

(24) 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.

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

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

(27) 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].

(28) 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]

(29) 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.

(30) 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.

(31) 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.

(32) Gerberick GF, Ryan CA, Kern PS, Dearman RJ, Kimber I, Patlewicz GY, et al. 2004. A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. Contact Dermatitis 50:274-288.

© OECD 2018

(33) ISO 10993-12:2012 Biological evaluation of medical devices Part 12: Sample preparation and reference materials.

(34) National Research Council. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington, D.C

(35) Olsson A, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. Lab Animals 2002;36:243- 270

(36) Van Loo PLP, Kruitwagenb CLJJ, Koolhaasc JM, Van de Weerdd HA, Van Zutphena LFM, Baumans V. Influence of cage enrichment on aggressive behaviour and physiological parameters in male mice. Applied Animal Behaviour Science. 2002;76(1):65-81

(37) Würbel H. Ideal homes?: housing effects on rodent brain and behavior. Trends in Neuroscience. 2001;24:207-211

(38) Würbel H, Garner JP. Refinement of rodent research through environmental enrichment and systematic randomization. NC3Rs. Published January 2007. https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Refinementenvironmentalenrichmentandsystematicrandomization.pdf. Accessed April 06, 2018

(39) Dahlborn K, Bugnon P, Nevalainen T, Raspa M, Verbost P and Spangenberg E. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification. Laboratory Animals. 2013;47:2-11.

(40) Norecopa. Toe Clipping: Evaluation and Alternatives. https://norecopa.no/media/6470/norecopa-toeclip.pdf Published 2008. Accessed April 9, 2018.

(41) Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. Nature Methods. 2010;7:825–826

© OECD 2018

## 付録 IB - 補遺 I：フローサイトメトリーによる BrdU 陽性 LNC の測定

この方法は、KoCVAM-coordinated validation study(1)で用いた LLNA:BrdU-FCM プロトコルに基づいている。実施施設において LLNA:BrdU-FCM を導入し使用する場合、本プロトコルを用いることが推奨される。

*測定前の調製*

1. 取り込まれた BrdU を測定するには、測定前に以下の試料を調製する必要がある。

- ブランク試料（n=1）:BrDU を注入しなかったマウスの LNC。
- 未処理試料（n=1）:いかなる物質による処置も受けていないが、BrdU を注入したマウスからの LNC。
- 溶媒対照投与試料（n≥4）:溶媒対照を投与し、BrdU を注入したマウスから採取した LNC。
- 被験化学物質投与試料（n≥4、最低 3 濃度）:被験化学物質を投与し、BrdU を注射したマウスから採取した LNC。
- 陽性対照投与試料（n≥4）:陽性対照を投与し、BrdU を注入したマウスから採取した LNC。

*フローサイトメトリーの結果の解析*

2. フローサイトメータは、試験実施前または定期的に、しかるべきツール（FACSCaliburTM 用 BD FACSComp または Cytomics FC500 用 Beckman coulter FlowCheck）を用いてキャリブレーションされている必要がある。

*前方散乱-側方散乱（FSC-SSC）グラフ*

1) X 軸(FSC)、Y 軸(SSC)ともに均等目盛とする。

2) FSC-SSC グラフの中心に生リンパ節のフロックを含む領域（ゲート）を設定する。

3) あてはまる細胞数が 1 万個以上になるようにゲートを設定する。

*7-AAD-BrdU グラフ*

1) X 軸(7-AAD、FL3)は均等目盛、Y 軸(BrdU、FL1)は対数目盛とする（図 1）。

* 非染色試料、BrDU 染色のみを実施した試料、7-AAD 染色のみを実施した試料のほか、抗 BrDU および 7-AAD の両者を用いた二重染色試料を用いて、本試験開始時にコンペンセーションを設定する。このコンペンセーションを、今後の使用のためにセーブしておくとよい。

*以下のステップに従って Q2 を設定する*

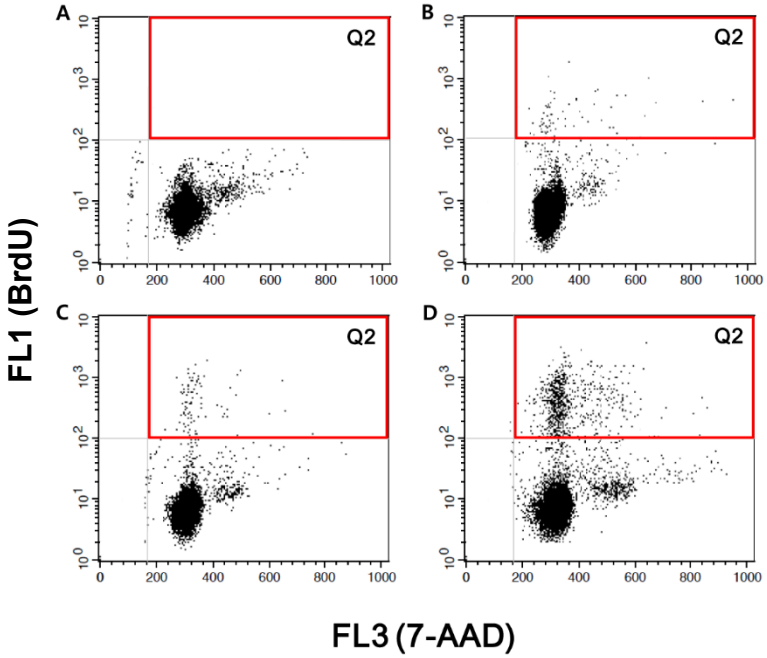
1) ブランク試料を用いて、細胞が存在しない Q2（右上）を設定する（図 1A）。

© OECD 2018

2) 未処理試料を用いて、BrdU 陽性細胞の百分率が全細胞の 1%程度となるように Q2 を設定する（図 1B）。

3) Q2 領域の百分率は、LNC 1 万個中の FITC 標識抗 BrdU 抗体陽性生リンパ球の割合を示す。

**図 1.BrdU 陽性細胞の百分率（%）を算出するためのフローサイトメトリー構成（Q2%）**




*注*：A=ブランク試料、B=無処置試料、C=溶媒対照投与試料、D=被験化学物質または陽性対照投与試料

***BrdU 陽性細胞数（%）***

3. 溶媒対照投与試料（図 1C）、被験化学物質投与試料および陽性対照投与試料（図 1D）にフローサイトメトリーを実施する。それぞれの試料について、「Quadrant Statistics」によりゲーティングした百分率データ（Q2 領域%）を求める。

***SI および EC2.7 の算出***

4. 溶媒対照群の LN 中の BrdU 陽性 LNC 数を、LN 中の LNC 数に、LNC 1 万個中の BrdU 発現細胞割合（フローサイトメトリーによって得た）を乗じて求める。被験物質群の LN 中の BrdU 陽性 LNC 数が、上記の方法により求まる。個々の SI は、被験物質投与群のマウスあたり BrdU 陽性 LNC 数を、溶媒対照群の BrdU 陽性 LNC 数の平均値で除して算出する。各被験化学物質群の平均 SI 値を、個々の SI 値に基づいて算出する。

$$\text{刺激指数（SI）} = \frac{\text{被験化学物質に曝露したマウスあたりの BrdU 陽性 LNC 数}}{\text{溶媒対照群の平均 BrdU 陽性 LNC 数}}$$

© OECD 2018

5. 陽性と判定された場合、次式を用いて線形回帰法により EC2.7（SI が 2.7 を示す推定濃度）を算出するとよい。

$$Y\ (SI) = aX(\text{濃度}) + b \rightarrow EC2.7 = (2.7-b)/a$$

* パラメータ a（傾き）および b（y 切片）を、線形最小二乗法を用いて求めることができる。

他の推定方法（線形補間法や外挿式など）を用いて EC2.7 値を算出してもよい (32)。

© OECD 2018