

原著 局所リンパ節アッセイの結果における溶媒の違いと 動物系統差の背景値に基づく総合的評価

昭和大学医学部法医学講座

上西 将路* 安齋 享征 佐藤 啓造
藤城 雅也 李 曉鵬 佐藤 淳一

抄録：OECD テストガイドライン 429 として採択された局所リンパ節アッセイ (Local Lymph Node Assay: LLNA) は、従来の皮膚感作性試験と比べて、より客観性の高い定量データが得られるだけでなく、その使用動物数の少なさから動物福祉の観点において望ましい評価法として世界各国で採用されている。しかし、その実用化において動物の系統あるいは溶媒の影響と考えられる検査結果の違いが現れるようになった。本研究では、溶媒の違いによる試験結果への影響を検討するとともに6種類のマウス系統における β 線量の背景値を検証材料に加えることで、系統差による溶媒への反応の影響を新たに総合的に評価した。本試験条件下において得られた欧州で入手可能なマウスの背景値には、3H-methylthymidine (3HTdR) の取り込み量の最も低い系統 (CBA/CaOlaHsd) と最も高い系統 (NMRI) で3HTdR の取り込み量 (dpm/LN 値) に約5倍の開きが認められた。この結果から、感作性物質のアレルギー活性の指標となる刺激性指数 (Stimulation Index: SI) が系統間で異なる可能性が示唆された。また、同じマウスの系統 CBA/CaHsdRcc (SPF) マウスにおいて、6種類の溶媒、アセトン/オリーブ油 (4/1, v/v) (AOO), エタノール/水 (70% EtOH), ジメチルホルムアミド (DMF), 2-ブタノン (BN), プロピレングリコール (PG), DMSO, の dpm/LN 値において、70% EtOH 群で最低値、DMSO 群で最高値が認められた。さらに、感作性物質 alpha-hexylcinnamaldehyde (HCA) を用いた溶媒間の比較において、感作性指標 EC3 に基づく場合、BN, DMF, 70% EtOH および PG を用いた場合は Moderate sensitizer に、AOO および DMSO を用いた場合は Weak sensitizer に分類された。以上の結果から、閾値に近い感作性物質においては、用いる溶媒の違いにより皮膚感作性の判定が異なる可能性が示唆された。本研究で用いられた動物の系統および溶媒以外にも数多くの試験材料が存在するため、試験材料の違いによる結果への影響を継続的に検証することは精度の高い試験法の確立に不可欠であると考えられる。したがって、今回のマウスの系統および溶媒による結果の違いを予め認識しておくことは LLNA の試験データの精度評価に有益であると考えられる。

キーワード：動物系統, 局所リンパ節アッセイ, OECD テストガイドライン, 皮膚感作性, 溶媒影響

日本における医薬部外品の製造販売承認申請および化粧品基準改正要請, あるいは欧州における化粧品原料を含む工業化学品の登録申請には, 申請対象となる化学物質の皮膚感作性評価が要求される。過去には, Maximization Test と Buehler Test 等¹⁾ の OECD テストガイドラインに代表されるモルモットを用いた感作性評価が一般的に用いられており, これらの試験法では感作成立後の惹起時における皮膚反応を判定する。一方で, 1986年に Kimber

らにより提案²⁾されたマウスを用いる局所リンパ節アッセイ (Local Lymph Node Assay: LLNA) は, 感作誘導期における局所リンパ節中の細胞増殖反応において放射性元素の取り込み量を測定するため, より客観性の高い感作性評価法とされている。

LLNA は, 世界各国の公的機関で評価され^{3,4)}, 2002年に OECD テストガイドライン 429 (OECD Guideline for Testing of Chemicals 429: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay) として

*責任著者

採択された後、2010年に改訂がなされている⁵⁾。LLNAは皮膚感作性を評価する試験法として広く普及しているが⁶⁻¹¹⁾、これ以外にもヒト細胞株活性化試験 (human Cell Line Activation Test; h-CLAT)¹²⁾、タンパク結合性測定法¹³⁾、ペプチド結合性試験 (Direct Peptide Reactivity Assay: DPRA)¹⁴⁾、構造活性相関システム (QSAR)¹⁵⁾、RIPT (Repeated Insult Patch Test: RIPT)^{16,17)}などが皮膚感作性の代替評価法として知られている。また、皮膚一次刺激性などの *in vitro* 評価法に用いられる3次元培養ヒト皮膚モデルを皮膚感作評価に応用する試みも将来の実用化に向けて期待されている¹⁸⁾。しかし、動物を用いた試験法に代わり、現在開発中の各種 *in vitro* 試験法が、国際的な標準試験法として確立されるまでには、かなりの時間が必要である。また、日本においては感作性の検出にラジオアイソトープ (RI) を用いない方法も開発されており、その更なる普及も期待されている¹⁹⁻²²⁾。しかし、日本においても海外で実施されるRIを用いたLLNAのデータを皮膚感作性評価に使用するケースは非常に多いため、RIを用いたLLNAの基礎データの収集は引き続き重要である。

世界的に普及しているLLNAであるが²³⁻²⁶⁾、擬陽性あるいは擬陰性が起りやすいという問題点を抱えている²⁷⁾。擬陽性および擬陰性が起こる原因の一つとして、実験材料、すなわち使用動物の系統や溶媒の違いにより、その反応性において実験結果に違いが生じることが考えられるが、これまでのLLNAにおける使用動物の系統差、溶媒に関する研究は少ない。本研究では、溶媒の違いによる試験結果への影響を検討し、さらに6種類のマウス系統における β 線量を測定し、³H-methylthymidine (3HTdR)の取り込み量 (dpm/LN値)の背景値として検証材料に加えることで、系統差による溶媒への反応の影響差を新たに総合的に評価した。

研究方法

1. 化学物質

一般的にLLNAにおいて溶媒として用いられる6つの物質、4:1 v/v acetone and olive oil (AOO), 7:3 v/v ethanol/water (ethanol: VWR International GmbH, Darmstadt, Germany) (70% EtOH), N,N-dimethylformamide (Merck KGaA, Darmstadt,

Germany) (DMF), 2-butanone (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (BN), propylene glycol (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) (PG) および dimethyl sulphoxide (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) (DMSO), を使用した。

感作性物質には、陽性対照物質として一般的に用いられている alpha-hexylcinnamaldehyde (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) (HCA) を5%、10%および25%の3濃度に調整し用いた。

2. 使用動物

本実験においては処置時点において8週齢～12週齢のメスのマウス7種類、CBA/CaOlaHsd (Harlan Laboratories BV, Netherland), CBA/CaHsdRcc (SPF) (RCC Ltd., Füllinsdorf, Switzerland), CBA/Ca (CruBR) (Harlan Laboratories BV, Netherland), CBA/Jlbn (SPF) (Harlan Laboratories BV, Netherland), CBA/JNCrj (Charles River, UK), BALB/cOlaHsd (以下、BALB/c) (Harlan Laboratories BV, Netherlands) および HanRcc:NMRI (以下、NMRI) (RCC Ltd., Füllinsdorf, Switzerland) を用いた。すべての動物は Makrolon Type-2 ケージ (Lignocel, Schill AG, Muttens, Switzerland) に個別飼育し、投与前5日間の順化を行った。飼育室内は温度 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 30～70%、換気回数 10～15回/時間に保たれ、午前6時から午後6時まで人工照明を行った。すべての操作は OECD Guideline for Testing of Chemicals, Updated Guideline 429 Skin Sensitisation; Local Lymph Node Assay (adopted 24 April 2002)²⁸⁾ を参考とした。

3. リンパ節中の細胞増殖の検出

毎日ほぼ一定の時刻にマウスの左右の耳介背部にマイクロピペッターを用いて、被験物質を3日間連続局所塗布した。耳介塗布初日から5日後にマウスの尾静脈より³H-methylthymidine (3HTdR) (GE Healthcare Bio-Science Limited, Buckinghamshire, England) を 250 μl 投与し、その後、約5時間後に安楽死させ、所属リンパ節を採取した。採取されたリンパ節は動物ごとにプールした後、セルストレーナ (mesh size, 200 μm) でろ過し、リンパ節細胞浮遊液 (LNC) を得た。LNCに5%の trichloroacetic acid (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) を約 3 ml を加え、 4°C で約 18 時間

処理した。その後、scintillation liquidが入ったプラスチック製のシンチレーション・バイアル (Perkin Elmer GmbH, Rodgau, Germany) に入れ、 β -scintillation counter (Tri-Carb 2900TR, Perkin Elmer [LAS] GmbH, Rodgau, Germany) により 3HTdR の dpm/LN 値を測定し、被験物質による免疫細胞の特異的増殖を検出した。

実験 1. 6 種類のマウス系統における dpm/LN 背景値測定試験

前述の方法を用いて、6 種類の系統のマウス、CBA/CaOlaHsd, CBA/Ca (CruBR), CBA/Jlbn (SPF), CBA/JNcrj, BALB/c および NMRI のそれぞれ 4 匹において、3HTdR のリンパ節ごとの 1 分あたりの取り込み量 (dpm/LN 値) を測定し、本試験条件下における系統ごとの dpm/LN 値の背景値を算出した。

実験 2. 系統差による dpm/LN 値への影響検討試験

2 種類の系統差による 3HTdR のリンパ節ごとの 1 分あたりの取り込み量の違いを観察するために、CBA/CaOlaHsd および CBA/CaHsdRcc (SPF) マウスをそれぞれ 5 匹用い、一般的に溶解性の低い化学物質に用いられる皮膚浸透性の高い DMSO を代表溶媒として局所暴露させた場合の dpm/LN 値、および無処置動物 (no-treatment control group: NCG) の dpm/LN 値を測定した。なお、系統的に近い動物間にはどのような差が現れるのかを確認するために、本実験においては比較的近い系統である CBA/CaOlaHsd および CBA/CaHsdRcc を選択した。

実験 3. 溶媒の違いによる dpm/LN 値への影響検討試験

溶媒の違いによる反応性の違いを観察するために、欧州で最も多く用いられる系統の一つ CBA/CaHsdRcc (SPF) マウスをそれぞれ 5 匹用い、AOO, 70% EtOH, DMF, BN, PG および DMSO をそれぞれ局所暴露させた場合の dpm/LN 値、および無処置動物 (NCG) の dpm/LN 値を測定した。

実験 4. HCA を投与した場合の溶媒の違いによる dpm/LN 値および Stimulation Index への影響検討試験

6 種類の溶媒における感作性物質 HCA に対する反応性の違いを観察するために、CBA/CaOlaHsd

Table 1 6 種類のマウス系統における dpm/LN 背景値測定試験の結果

Strains	dpm/LN
CBA/CaOlaHsd	130
CBA/Ca (CruBR)	358
CBA/Jlbn (SPF)	393
CBA/JNcrj	262
BALB/c	185
NMRI	554

6 種類の系統のマウス、CBA/CaOlaHsd, CBA/Ca (CruBR), CBA/Jlbn (SPF), CBA/JNcrj, BALB/c および NMRI のそれぞれ 4 匹において、3H-methylthymidine (3HTdR) のリンパ節ごとの 1 分あたりの β 線量 (dpm/LN 値) を測定し、本試験条件下における系統ごとの dpm/LN 値の背景値を算出した。

マウスそれぞれ 4 匹を用い、5%, 10%, 25% (v/v) の濃度の HCA および 6 種類の溶媒、AOO, 70% EtOH, DMF, BN, PG, および DMSO をそれぞれ局所暴露させた場合の dpm/LN 値を測定し、刺激性指数 (Stimulation Index: SI) が 3 になる濃度、すなわち Estimated concentration for a STIMULATION INDEX of 3 (EC3; Extreme [< 0.1], Strong [$0.1 \leq$ to < 1], Moderate [$1 \leq$ to < 10] および Weak [$10 \leq$ to < 100]) を算出した。

結 果

実験 1. 6 種類のマウス系統における dpm/LN 背景値測定試験の結果

6 種類のマウスをそれぞれ 4 匹用い、3HTdR のリンパ節ごとの 1 分あたりの取り込み量を測定した結果、系統ごとの背景値となる dpm/LN 値は異なっていた。それぞれのマウスにおける dpm/LN 値は、CBA/CaOlaHsd において 130, CBA/Ca (CruBR) において 358, CBA/Jlbn (SPF) において 393, CBA/JNcrj において 262, Balb/c において 185, および NMRI において 554 であった。最低値を示した CBA/CaOlaHsd と最高値を示した NMRI マウスにおいては dpm/LN 値の差が 424 であった (Table 1)。

実験 2. 系統差による dpm/LN 値への影響検討試験の結果

CBA/CaOlaHsd と CBA/CaHsdRcc (SPF) マウ

Table 2 系統差による dpm/LN 値への影響検討試験の結果

Strains	dpm/LN	
	Vehicle	mean \pm SD
CBA/CaOlaHsd	NCG	182 \pm 78
CBA/CaHsdRcc (SPF)	NCG	189 \pm 54
CBA/CaOlaHsd	DMSO	406 \pm 133
CBA/CaHsdRcc (SPF)	DMSO	682 \pm 151

CBA/CaOlaHsd および CBA/CaHsdRcc (SPF) マウスをそれぞれ5匹用い、dimethyl sulphoxide (DMSO) を局所暴露させた群と無処置群 (no-treatment control group: NCG) の dpm/LN 値を測定した (文献²⁹より引用)。

スの2種類をそれぞれ5匹用い、DMSOを局所暴露させた場合の dpm/LN 値、および NCG の dpm/LN 値を測定した結果、CBA/CaOlaHsd マウスの DMSO 適用群の dpm/LN 値は 406 であったのに対し、CBA/CaHsdRcc (SPF) マウスにおける dpm/LN 値は 682 であった (Table 2)。

実験3. 溶媒の違いによる dpm/LN 値への影響検討試験の結果

CBA/CaHsdRcc (SPF) マウスをそれぞれ5匹用い、AOO, 70% EtOH, DMF, BN, PG および DMSO をそれぞれ局所暴露させた場合の dpm/LN 値、および NCG の dpm/LN 値を測定した結果、NCG を除いて最も低値を示したのは 70% EtOH であり、続いて PG, DMF, AOO, BN, DMSO の順であった。最も低値を示した 70% EtOH と DMSO の dpm/LN 値の差は 550 であった。なお、DMSO については実験2のデータを引用した (Table 3)。

実験4. HCA を投与した場合の溶媒の違いによる dpm/LN 値および Stimulation Index への影響検討試験の結果

CBA/CaOlaHsd マウスそれぞれ4匹を用い、5%, 10%, 25% (v/v) の濃度の HCA および6種類の溶媒、AOO, 70% EtOH, DMF, BN, PG, および DMSO をそれぞれ局所暴露させた場合の dpm/LN 値を測定した結果、HCA 濃度5%において最も高い値を示した溶媒は DMSO であり、これに続いて BN, DMF の順に高値であった。HCA 濃度10%において最も高い値を示した溶媒は DMF であり、これに続き DMSO, PG, BN の順に高い値

Table 3 溶媒の違いによる dpm/LN 値への影響検討試験の結果

Vehicles	dpm/LN
	mean \pm SD
NCG	189 \pm 54
AOO	294 \pm 46
EtOH70%	132 \pm 55
DMF	235 \pm 108
BN	320 \pm 124
PG	219 \pm 40
DMSO	682 \pm 151

CBA/CaHsdRcc (SPF) マウスをそれぞれ5匹用い、4:1 v/v acetone and olive oil (AOO), 7:3 v/v ethanol/water (70% EtOH), N,N-dimethylformamide (DMF), 2-butanone (BN), propylene glycol (PG) および dimethyl sulphoxide (DMSO) をそれぞれ局所暴露させた場合の ³H-methylthymidine (3HTdR) の取り込み量 (dpm/LN 値)、および無処置動物 (no-treatment control group: NCG) の取り込み量 (dpm/LN 値) を測定した。なお、DMSO については実験2 (Table 2) のデータを引用した (文献²⁹より引用)。

を示した。HCA 濃度25%において最も高い値を示した溶媒は DMSO であり、これに続き PG, DMF, AOO および 70% EtOH の順に高い値を示した。HCA 濃度25%における dpm/LN 値の最低値を示した BN と最高値を示した DMSO の差は 2,395 であった。すべての溶媒において濃度依存的に 3HTdR の取り込み量 (dpm/LN 値) の上昇が見られた (Table 4)。

また、アレルギー活性の指標となる Stimulation Index (SI) を算出した結果、HCA 濃度5%において SI:3 以上を示したのは BN のみであった。HCA 濃度10%においては AOO と DMSO を除くすべての溶媒で SI が 3 以上となり、25%においてすべての溶媒において SI が 3 以上となった。さらに SI が 3 になる濃度、すなわち EC3 を算出した結果、最低値を示した BN (EC3: 1.76) と最高値を示した DMSO (EC3: 16.21) の EC3 の差は 14.45 であった (Table 5)。

考 察

OECD のテストガイドライン (TG429) に採択された 2002 年以降、世界中で多くの LLNA 試験が

Table 4 HCA を投与した場合の溶媒の違いによる dpm/LN 値への影響検討試験の結果

HCA Concentration (%)	dpm/LN					
	AOO	70% EtOH	DMF	BN	PG	DMSO
0	334	211	437	296	364	1,055
5	504	512	1,096	1,229	578	1,614
10	755	960	2,627	1,705	1,736	1,952
25	2,804	2,764	2,869	2,589	3,649	4,984

CBA/CaOlaHsd マウスそれぞれ 4 匹を用い、5%、10%、25% (v/v) の濃度の alpha-hexylcinnamaldehyde (HCA) および 6 種類の溶媒、4:1 v/v acetone and olive oil (AOO)、7:3 v/v ethanol/water (70% EtOH)、N,N-dimethylformamide (DMF)、2-butanone (BN)、propylene glycol (PG) および dimethyl sulphoxide (DMSO) をそれぞれ局所暴露させた場合の dpm/LN 値を測定した (文献²⁹⁾ より引用)。

Table 5 HCA を投与した場合の溶媒の違いによる Stimulation Index への影響検討試験の結果

HCA Concentration (%)	Stimulation Index (SI)					
	AOO	70% EtOH	DMF	BN	PG	DMSO
0	1	1	1	1	1	1
5	1.5	2.4	2.5	4.1	1.6	1.5
10	2.3	4.6	6.0	5.8	4.8	1.8
25	8.4	13.1	6.6	8.7	10.0	4.7
EC3	11.72	6.36	5.71	1.76	7.35	16.21

CBA/CaOlaHsd マウスそれぞれ 4 匹を用い、5%、10%、25% (v/v) の濃度の alpha-hexylcinnamaldehyde (HCA) および 6 種類の溶媒、4:1 v/v acetone and olive oil (AOO)、7:3 v/v ethanol/water (70% EtOH)、N,N-dimethylformamide (DMF)、2-butanone (BN)、propylene glycol (PG) および dimethyl sulphoxide (DMSO) をそれぞれ局所暴露させた場合の刺激性指数 (Stimulation Index: SI) が 3 になる濃度、すなわち Estimated concentration for a STIMULATION INDEX of 3 (EC3) を算出した (文献²⁹⁾ より引用)。

実施されてきた。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で、その増殖は、各試験群の増殖の平均値と、溶媒対照群の増殖の平均値との比較 (刺激指数: SI) により測定される。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。しかし、試験施設ごとに用いられる実験材料の中でも、特に欧州で用いられる動物の系統は日本で用いられる系統とは異なる場合も多い^{9,10)}。日本における皮膚感作性評価には、欧州で実施された LLNA のデータを用いるケースが多いため、欧州で多用される動物の系統および溶媒による試験結果への影響を把握しておくことは重要である。本研究では、溶媒の違いに

よる試験結果への影響を検討し、さらに 6 種類のマウス系統における β 線量を測定し dpm/LN 値の背景値を検証材料に加えることで、系統差による溶媒への反応の影響差を新たに総合的に評価した。

実験 1 では、世界中で使用されている複数系統における背景値の系統差異の感作性結果へ影響の可能性について、供給可能な限られた匹数での試験条件下にて検証した。

実験 2～4 では、使用溶媒の違いの影響の検証に重きを置いているが、これらの実験結果は、Experimental Animals に発表 (T. Anzai *et al*) されており、本論文における考察も同論文を参考とした²⁹⁾。

6 種類のマウスの系統差においては、実験 1 の結果が示すように、欧州で入手可能なマウスの背景値の最も低い系統 (CBA/CaOlaHsd) と最も高い系統 (NMRI) で 3HTdR の取り込み量に約 5 倍の開きが認められた (Table 1)。アレルギー活性の指標

となる Stimulation Index (SI), すなわち溶媒対照群に対する被検物質投与群の 3HTdR の取り込み量の比は 3 倍を超えた際に陽性と判定されるために, 前者は見かけの SI が高くなり, 後者は見かけの SI が低くなる可能性が示唆された。これらの結果を踏まえると, 今後系統ごとの反応性の差と感作性を相関的に評価する場合は, 適切な例数に基づく系統の背景値の集積および統計学的有意性に基づく精度検証が必要であると考えられる。また, 同一の感作性物質を用いて複数の系統における LLNA 試験を実施する等, 系統間の直接対比を行うことで日本でも入手可能な動物を含めた詳細な系統比較が可能になると考えられる。

さらに, 実験 2 の結果が示すように, 同じ溶媒である DMSO を用いながらも, マウスの系統の違いにより 3HTdR の取り込み量に差が認められた (Table 2)。また, DMSO における両系統の dpm/LN 値の差は, NCG との比較においても明らかな差が認められている (Table 2)。これらの結果から, CBA/CaHsdRcc が CBA/CaOlaHsd よりも DMSO に対して感受性が高いことがその理由として考えられる。しかし, これらの差を評価するためには, さらに系統的に離れた動物との比較検証を行う必要がある。本実験においては溶媒として DMSO のみを用いたが, OECD TG429 で推奨されている他の溶媒を用いた場合, 系統間の反応性の違いはどのように現れるのか今後実験を継続していく必要がある。

また, 実験 3 の結果が示すように, 同じマウスの系統でありながら用いる溶媒によって, 3HTdR の取り込み量に差が認められた (Table 3)。実験材料の中でも, 溶媒は被検物質を体内に適切に運搬することができる種類を選択するべきであるが, 本実験で得られた結果のみから LLNA に望ましい溶媒を特定することは難しい。しかし, 実験施設間において溶媒の違いが問題となる場合, あるいは, 類似医薬品および類似化学物質の評価において異なる溶媒を用いて入手したデータを比較する場合に, 予め溶媒の影響を把握しておくことは, 今後統計学的有意性に基づく精度の高い感作性評価をするためにも重要であると考えられる。

さらに, これらの実験結果を踏まえて実施された感作性物質 HCA を用いた実験 4 においても溶媒の影響と考えられる差が認められた (Table 4)。上述

する試験データへの影響は, 最終的にはヒトにおける皮膚感作性の推測に影響を与えることを示唆するものであるが, これらの変化を補足する結果として EC3 における最低値を示した BN と最大値を示した DMSO の差は 14.45 であった (Table 5)。HCA と 6 種類の溶媒の組み合わせによる実験 4 により算出された EC3 の評価方法として Recommended scheme using EC3 values derived from the local lymph node assay (Kimber ら, 2003) に紹介されている 4 段階の判定方法, すなわち, Extream (< 0.1), Strong ($0.1 \leq to < 1$), Moderate ($1 \leq to < 10$), および Weak ($10 \leq to < 100$) に照合した場合³⁰⁾, 溶媒として BN, DMF, 70% EtOH および PG を用いた場合の EC3 は 10 以下となるため HCA は Moderate sensitizer に分類される。一方, AOO および DMSO を用いた場合は EC3 が 10 を超えるため, Weak sensitizer に分類される。本判定方法に基づく, HCA の感作性評価が溶媒の違いにより変化するため, 特に閾値に近い感作性物質においては, 用いる溶媒の違いにより皮膚感作性の判定が異なる可能性が示唆された。このように同じ判定方法を用いても, 溶媒の違いによる影響で判定結果が異なることが他の感作性物質においても起りうるのか, 他の感作性物質に対しても検証する必要があると考えられる。

溶媒の違いにより異なる結果が得られる要因として, 被検物質の溶媒への溶解性, あるいは溶液あるいは懸濁液等異なる性状における経皮浸透性の違い等が考えられる。しかし, 本研究で用いられた動物の系統および溶媒以外にも世界には数多くの試験材料が存在するため, 試験材料の違いによる皮膚感作性の判定への影響を継続的に統計学的有意性に基づき検証することは精度の高い LLNA 法およびその代替法の確立に不可欠であると考えられる。したがって, 今回のマウスの系統および溶媒による結果の違いを予め認識しておくことは今後の LLNA の試験データの精度評価に有益であると考えられる。

利益相反

本論文に関し, 公開すべき利益相反関係はない。

文 献

- 1) OECD. OECD Guidelines for the testing of chemicals, section 4. (test guideline 406:Skin

- sensitization). 1992. (accessed 2015 Dec 16) http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-406-skin-sensitisation_9789264070660-en;jsessionid=20ig67i4hwgwa.x-oecd-live-02
- 2) Kimber I, Mitchell JA, Griffin AC. Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. *Food Chem Toxicol.* 1986;24:585-586.
 - 3) National Institute of Environmental Health Sciences. 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 ICCVAM and the NICEATM. 1999. (accessed 2015 Dec 16) http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/lna/lnarep.pdf
 - 4) European Commission. Joint Research Center for Skin Sensitisation (accessed 2015 DEC 16) <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance/topical-toxicity/skin-sensitisation>
 - 5) OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 (test guideline 429: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay). 2010. (accessed 2015 Dec 16) http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-429-skin-sensitisation_9789264071100-en;jsessionid=cie018np8qojf.x-oecd-live-02
 - 6) Kimber I, Basketter DA. The murine local lymph node assay: a commentary on collaborative studies and new directions. *Food Chem Toxicol.* 1992;30:165-169.
 - 7) Kimber I, Hilton J, Weisenberger C. The murine local lymph node assay for identification of contact allergens: a preliminary evaluation of in situ measurement of lymphocyte proliferation. *Contact Dermatitis.* 1989;21:215-220.
 - 8) Basketter DA, Balikie L, Dearman RJ, *et al.* Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis.* 2000;42:344-348.
 - 9) Ehling G, Hecht M, Heusener A, *et al.* An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicology.* 2005;212:60-68.
 - 10) National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme (NICNAS). Full public report. ADEKA REASOAP SR-10; 2007.
 - 11) Yamashita K, Idehara K, Fukuda N, *et al.* Development of a Modified Local Lymph Node Assay using ATP Measurement as an Endpoint. *AATEX.* 2005;11:136-144.
 - 12) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, *et al.* Assessment of the human cell line activation test (h-CLAT) for skin sensitization; Results of the first Japanese inter-laboratory study. *AATEX.* 2008;13:27-35.
 - 13) Frostell-Karlsson A, Remaeus A, Roos H, *et al.* Biosensor analysis of the interaction between immobilized human serum albumin and drug compounds for prediction of human serum albumin binding levels. *J Med Chem.* 2000;43:1986-1992.
 - 14) OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 (test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)). 2015. (accessed 2015 Dec 16) http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation_9789264229709-en;jsessionid=1gmfnb7ynvjf.x-oecd-live-03
 - 15) OECD. Environment Directorate, ENV/JM/MONO (2007) 2, (Quantitative) Structure-activity relationship [(Q) SAR] models, Joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemicals, pesticides and biotechnology., 30-Mar-2007 (accessed 2015 Dec 16) [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono\(2007\)2](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono(2007)2)
 - 16) Baran R, Haward IM. Predicting adverse skin effects. In *Textbook of cosmetic dermatology. 3rd ed.* London: Martin Dunitz Ltd; 2004. pp344.
 - 17) Georgeian K, Dosik J. Repeated Insult Patch Study Supplemented with Additional Supporting Materials Satisfying 40 CFR §26.1303 for [Repellent Code] 1000718-008, concentrate of 1000718-009. Unpublished study prepared by TKL Research, Inc. under Project No. DS104005/104105-1; MRID 47077102; 2005: p153.
 - 18) 内野 正, 竹澤俊明, 五十嵐良明, ほか. 樹状細胞を含む三次元培養ヒト皮膚モデルの構築とその皮膚感作性試験への応用. *薬誌.* 2008; 128:45-50.
 - 19) Takeyoshi M, Noda S, Yamazaki S, *et al.* Assessment of the skin sensitization potency of eugenol and its dimers using a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J Appl Toxicol.* 2004;24:77-81.
 - 20) Takeyoshi M, Yamazaki K, Yakabe Y, *et al.* Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicol Lett.* 2001;119:203-208.

- 21) Takeyoshi M, Sawaki M, Yamazaki K, *et al.* Assessment of statistic analysis in non-radioisotopic local lymph node assay (non-RI-LLNA) with alpha-hexylcinnamic aldehyde as an example. *Toxicology*. 2003;191:259-263.
- 22) Hayashi D, Nozaki Y, Takagi H, *et al.* Sensitivity Comparison of 3 CBA Mouse Strains under the LLNA:BrDU-ELISA Test Method. *AATEX*. 2012;17:63-68.
- 23) ECVAM *In-Vitro* Method Unit. ESAC statement on the performance standards (PSs) for the local lymph node assay (LLNA). 2008. (accessed 2015 Dec 16) <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance/docs-skin-sen/LLNA%20PSs%20ESAC%20Statement.pdf>
- 24) Environmental Protection Agency (EPA). Health effects test guidelines OPPTS 870.2600. Skin Sensitization. March 2003. (accessed 2015 Dec 16) https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/supdocs/feddocs/epa/epa_870r_2600.pdf
- 25) National Toxicology Program (NTP). ICCVAM evaluation of the validation status of the LLNA. (accessed 2015 Dec 16) <https://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/test-method-evaluations/immunotoxicity/llna/index.html>
- 26) The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). Note for Guidance on Non-Clinical Local Tolerance Testing of Medicinal Products. 2001. (accessed 2015 Dec 16) http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003315.pdf
- 27) National Institute of Environmental Health Sciences. 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 ICCVAM and the NICEATM. NIH publication No. 99-4494. 1999. (accessed 2015 Dec 16) https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf
- 28) OECD. OECD Guideline for the testing of chemicals: skin sensitization: local lymph node assay. (OECD test guideline; 429). 2002. (accessed 2015 Dec 16) <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/45124696.pdf>
- 29) Anzai T, Ullmann LG, Hayashi D, *et al.* Effects of strain differences and vehicles on results of local lymph node assays. *Exp Anim*. 2010;59:245-249.
- 30) Kimber I, Basketter DA, Butler M, *et al.* Classification of contact allergens according to potency: proposals. *Food Chem Toxicol*. 2003;41:1799-1809.

COMPREHENSIVE EVALUATION OF VEHICLE DIFFERENCE
AND STRAIN BACKGROUND DATA ON THE RESULTS
OF LOCAL LYMPH NODE ASSAYMasamichi KAMINISHI, Takayuki ANZAI, Keizo SATO,
Masaya FUJISHIRO, Xiao-Pen LEE and Junichi SATO

Department of Legal Medicine, Showa University School of Medicine

Abstract — The local lymph node assay (LLNA), adopted and globally referred to as OECD Testing Guideline 429, has several advantages of quantitative data, and the reduced number of animals used compared to the conventional skin sensitization tests from the viewpoint of data objectivity and animal welfare; however, the analysis of accumulated LLNA data reveals that the animal strains and vehicles employed are likely to affect LLNA results. The purpose of this study was to comprehensively evaluate the effects on determination of skin sensitization in LLNA, potentially caused by selection of animal strains and vehicles. We investigated the background data on 6 mouse strains, commonly used in Europe, on the incorporation of 3H-methyl thymidine (3HTdR), measured by β -scintillation counter as disintegrations per minute (dpm/LN level), in addition to the data of vehicle difference in the local lymph node response. Under the conditions of this study, about a 5-fold difference in dpm/LN level was noted between the lowest background data of CBA/CaOlaHsd and the highest of NMRI. This result suggested that the criteria of allergy activation Stimulation Index (SI) in LLNA may be determined differently depending on animal strains. A vehicle difference in the local lymph node response was observed when CBA/CaHsdRcc (SPF) were exposed to 6 vehicles; 4:1 v/v acetone and olive oil (AOO), ethanol/water (70% EtOH), N,N-dimethylformamide (DMF), 2-butanone (BN), propylene glycol (PG) and dimethyl sulphoxide (DMSO). This experiment showed that the dpm/LN level was lowest in the 70% EtOH group and highest in the DMSO group. When alpha-hexylcinnamaldehyde (HCA) was used as a sensitizer, calculated sensitizer criteria EC3 values showed a weak sensitizer when AOO and DMSO were used as vehicles, while it was a moderate sensitizer when the other 4 vehicles were used. These results suggested that there are vehicle differences in the dpm/LN level in LLNA, and that the sensitization potency of sensitizer may be classified into different categories when using different vehicles. Because there are many animal strains and vehicles other than those employed in this study, further studies comparing LLNA results among animal strains and vehicles commonly used are needed to clarify the reliability of the LLNA. Therefore, this study which suggests the necessity of careful consideration in selection of animal strain and vehicle should be referred for further evaluations on data precision in LLNA.

Key words: animal strain, local lymph node assay, OECD test guideline, skin sensitization, vehicle effect

〔受付：3月15日，受理：5月17日，2016〕