

化粧品・医薬部外品の安全性評価に 感作性試験代替法としての LLNA を活用するためのガイダンス（案）

医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請では、化学物質の感作性を評価するために、従来から、モルモットを用いた皮膚感作性試験が最も一般的に用いられてきている。OECD テストガイドラインに記載されている試験法としては、Maximization Test と Buehler Test がある¹⁾。これらの試験法は、感作成立後の惹起時における皮膚反応を判定することにより、化学物質の感作性を評価できる。

一方、1986年に Kimber らにより提案²⁾された、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を指標とした、マウスを用いる皮膚感作性試験法である。本試験法は、これまでに、欧米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) として採択され、2010年に改訂がなされている⁵⁾。現在では、欧米を中心に化粧品原料を含む化学物質等の申請に用いられるようになり、世界的に広く受け入れられている⁶⁾。本試験法は、長年広く使われてきた Maximization Test や Buehler Test に比べ、動物に与える苦痛の低減や評価に用いる動物数の低減という点で意義ある動物実験代替法の一つと考えられている。また、従来のモルモットを用いた試験法は、惹起時の皮膚反応を肉眼判定するが、LLNA では細胞増殖反応を放射性同位元素の取り込みで測定しているため、より客観的な試験となっている。

また、本試験法は、日本においても、厚生労働科学研究「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討」の感作性分科会⁷⁾において議論され、医薬部外品の皮膚感作性の有無を Maximization Test と同等に評価ができる皮膚感作性試験法であると結論付けられている。

そこで、本ガイダンス案では、皮膚感作性試験法としての LLNA の利用促進に向けて、OECD テストガイドライン 429 に記載された方法 (reduced LLNA: rLLNA は除く) 及びその留意点を解説し、医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請として本試験を用いることを提案する。

1. 試験法の概要

1-1. 原理

感作性を有する低分子量の化学物質は、経皮に浸透し、そのまま又は生体のタンパク質と結合した後、皮膚中の樹状細胞に取り込まれるものと考えられている。その後、活性化した樹状細胞は皮膚から所属リンパ節へ遊走し、そこで抗原提示を介して抗原特異的な (感作性物質に特異的に反応する) T 細胞の増殖を誘導し、次いで特異的な T 細胞 (感作 T 細胞) は全身に分布する。この一連の生体応答が感作と呼ばれている。LLNA では、感作誘導期のリンパ節における抗原特異的な T 細胞の増殖 (DNA 合成) を、放射性ヌクレオ

シンドの DNA への取り込みを指標として評価する。

1-2. 試験手順及び判定

1-2-1. 試験手順

詳細は、OECD テストガイドライン 429 を参照する (図 1)。

8~12 週齢の CBA/Ca あるいは CBA/J 系の雌マウスを使用し、個々の動物の体重が試験に供する全動物の平均体重値の±20%を超えないようにする。試験群としては、溶媒対照群 (陰性対照群) の他 3 群以上の被験物質用量群を設定し、通常、陽性対照群を加える。

1 群当り最低 4 匹を用いる。全ての投与群で、マウスの両耳の耳介に被験物質を 25 μ L を 3 日間繰り返し塗り塗りし、その 3 日後に [³H-Methyl]-thymidine (³H-TdR) (又は [¹²⁵I]-iododeoxyuridine (¹²⁵I-IUdR) 及び fluorodeoxyuridine) を尾静脈投与する。その 5 時間後に耳介リンパ節を摘出し、その中に取り込まれた ³H-TdR (又は ¹²⁵I-IUdR) の放射活性を測定する。

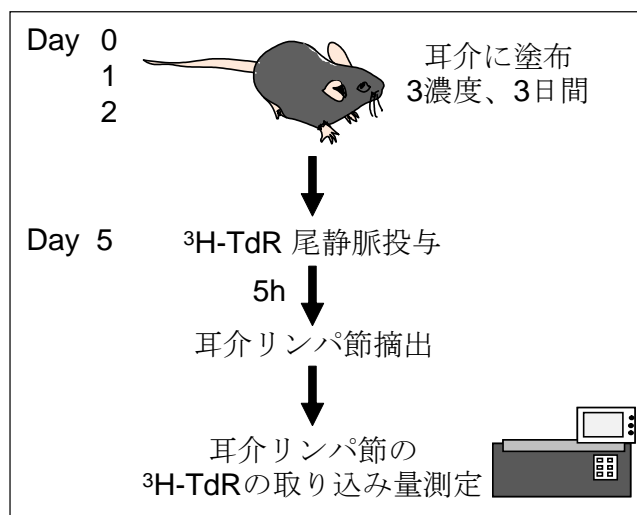


図 1 LLNA の概略 (³H-TdR を用いた場合)

1-2-2. 判定

溶媒対照群に対する被験物質投与群の ³H-TdR (又は ¹²⁵I-IUdR) の取り込み量の比 (Stimulation index : SI) が 3 倍を越えた際に、陽性と判定する。ただし、結果が明確でない場合は、用量相関性の強さ、統計学的有意差、陰性対照群及び陽性対照群の反応も考慮する^{8, 9, 10, 11)}。

1-3. 試験実施上の留意点

1-3-1. 試験実施における各種条件及び注意事項

① 溶媒の選択

使用溶媒は被験物質の溶解性を考慮し、溶液または懸濁液として最も高濃度で適用可

能な溶媒を選択する。皮膚への適用性から acetone : olive oil (4 : 1, v/v ; AOO)、N,N-dimethylformamide (DMF)、methyl ethyl ketone、propylene glycol、dimethylsulfoxide 等が推奨される。また、エタノール溶液 (例えば、70%エタノール) も使用可能である。水溶性の被験物質の場合、適切な溶解剤 (例えば、1% Pluronic® L92) を用い、皮膚の保湿性を保ちつつ、直ちに流れ落ちないようにする必要がある。十分な科学的根拠があればその他の溶媒でも使用可能であるが、皮膚に対する付着性が悪い水溶液の使用は避ける。

② 塗布濃度設定の方法

被験物質の塗布濃度は、100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%等、OECD テストガイドライン 429 で既定された濃度系列から、連続した少なくとも3用量を用いる。

最高塗布濃度には、全身毒性や強度の皮膚刺激性を生じない最も高い濃度を用いる。全身毒性や強度の皮膚刺激性を生じない濃度は、急性毒性、皮膚刺激性等の毒性情報や類似構造を含む物質や物理化学的特性情報等、利用可能な全ての情報を参照して決定する。これら既存情報から当該濃度を推察できない場合は、以下に示す予備スクリーニング試験を実施して設定する。

【予備スクリーニング試験】

1 濃度につき 1~2 匹の動物を用い、本試験と同様に被験物質による塗布を行う。ただし、放射性同位元素の尾静脈投与は行わない。塗布濃度は、原則として被験物質の性状が液体である場合は100%、固形物、懸濁物の場合は調製可能な最高濃度とする。他の動物種 (モルモット等) で得られた情報のうち、類似条件で行われた利用可能な情報がある場合はその条件を参考にする。

全身毒性は、試験期間中の一般状態の変化と被験物質処置前および最終処置の2日後の体重変化率を指標として評価する。皮膚刺激性は、被験物質処置前、処置3日目、最終処置の2日後に、塗布部位の皮膚所見の観察と、耳介の厚さを測定して評価する。すなわち、投与期間中 (被験物質処置開始日~最終処置2日後) に神経機能の変化 (立毛、運動失調、振戦、痙攣等)、行動変化、行動量変化、呼吸パターンの変化、傾眠、無反応症状、摂食量変化、ストレス症状等の一般状態の異常を認める場合、あるいは試験1日目から6日目の間で5%を超えた体重減少を生じる場合は、全身毒性があると判定する。また、試験開始後3日、6日に実施した刺激性評価において、2回の測定の間方、またはどちらかの耳介で、中等度以上の紅斑を示す所見を認める場合や、耳介厚の増減率が+25%以上となる場合は、過度の刺激性があると判断する⁵⁾。

以上の結果を踏まえ、100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%等、OECD テストガイドライン 429 で既定された濃度系列の中から、原則として、全身毒性反応

や過度の刺激性反応が認められなかった最高濃度を本試験の最高用量に設定する。

③ 注意事項

- ・ ある種の金属化合物では、感作性物質を識別できないことがある。
- ・ ある種の皮膚刺激性物質（界面活性剤等）で偽陽性反応を生じることがある。

1-3-2. 試験成立条件について

試験が適正に実施されたことは、反応強度が明らかな陽性対照物質を用いて、SI 値が 3 を超えることを確認する。試験毎に陽性対照群として 25% ヘキシルシンナミックアルデヒドや 5%メルカプトベンゾチアゾール等を投与する群を設定する。ただし、LLNA を定常的に実施し、陽性対照物質の背景データより試験結果の再現性や正確性を確認できる実験施設の場合には、陽性対照物質を試験に供するのは一定期間毎（例えば、6 箇月毎）でもよい。

2. LLNA の利用について

2.1. LLNA の運用及び適用範囲

本試験はマウスを用いる試験法であることから、動物実験の完全な置き換えとなる代替法ではない。一方で、動物福祉的観点、試験結果の定量性、及び、従来のもルモットを用いた試験法（Maximization Test）と同程度の予測性精度を有していることから、従来試験法とは独立した皮膚感作性試験法として、医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請に利用可能とする。ただし、製剤の試験には利用できない。

- ① 適正に実施された LLNA で陰性と判定された場合には、当該物質の皮膚感作性は陰性と、陽性と判定された場合には皮膚感作性は陽性と結論し、原則としてそれ以上の追加試験は必要とされない。
- ② 但し、適正に実施された LLNA で、陽性と判断された場合でも、既に十分に使用実績のあることが知られている類縁物質の皮膚感作性データとの比較あるいは従来のアジュバントを用いないもルモット皮膚感作性試験による追加データ等から総合的に、皮膚感作性の安全性を担保できることがある。
- ③ LLNA が適正に実施できなかつたと判断された場合、あるいは、LLNA の利用が適切でないと考えられる被験物質の場合、従来のもルモットを用いる皮膚感作性試験を実施する。

2.2. 添付資料について

LLNA を定常的に実施する施設において、陽性対照物質を試験に供さない場合、その施設における陽性対照物質の背景データの提出が必要になる場合がある。

3. 引用文献

- 1) OECD, 1992, OECD test guideline 406; OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Skin Sensitization:
<<http://oberon.sourceoecd.org/vl=28459316/cl=11/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/v1n4/s6/p1>>
- 2) Kimber I. et al., 1986, Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. Food Chem Toxicol, 24, 585-586.
- 3) ICCVAM – Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, 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 ICCVAM and the NICEATM. NIH publication No. 99-4494. National Institute of Environmental Health Sciences.
<<http://www.iccvam.niehs.nih.gov>>
- 4) Balls M. and Hellsten E., 2000, Statement on the validity of the local lymph node assay for skin sensitization testing. ECVAM Joint Research Centre, European Commission, Ispra, Italy. ATLA 28, 366-367.
- 5) OECD, 2010, OECD test guideline 429; OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay,
<http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD-TG429-2010.pdf>
- 6) 医薬品非臨床試験法ガイドライン研究会編、医薬品非臨床試験法ガイドライン解説 2010(薬事日報社)、2-7 皮膚感作性試験、p.71-76
- 7) 感作性分科会、医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会最終報告書－感作性分科会報告－、平成 21 年度厚生労働科学研究 動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究 (平成 22 年 4 月)
- 8) Basketter D.A. et al., 1999, A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. J Appl Toxicol, 19(4), 261-266.
- 9) Boussiquet-Leroux C. et al., 1995, Evaluation of lymphocyte proliferation by immunohistochemistry in the local lymph node assay. J Appl Toxicol, 15(6), 465-475.
- 10) Angers-Loustau A. et al., 2011, The regulation use of the local lymph node assay for the notification of new chemicals in Europe. Reg Toxicol Pharm, 60, 300-307..
- 11) Kimber I and Dearmann R.J., 2010, The local lymph node assay and skin sensitization

testing. In "Immunotoxicity Testing. Methods and Principles. Methods in Molecular Biology, vol.598", ed by Diertert RR, Humana Press, p.221-231