

LLNA: BrdU-ELISA 法による GHS 皮膚感作性細区分基準の確立と 国連 GHS 文書改訂に向けた取り組み

発表者：小林 俊夫 (日田事業所)

1. 背景及び目的

「化学品の分類及び表示に関する世界調和システム (The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals、以下 GHS)」は、国際的に統一された化学物質の有害性情報の伝達システムであり、ヒト健康、環境等に対する有害性の有無並びに強度に応じた分類方法が制定されている。皮膚感作性については、感作性物質は「区分 1」と分類され、さらにその強度に応じ「区分 1A: 強い感作性物質」及び「区分 1B: その他の感作性物質」の細区分が規定されている。皮膚感作性の GHS 分類は OECD で承認された試験法 (TG、テストガイドライン) で得られた結果から判定可能であり、動物を用いる代表的な皮膚感作性試験としてマウスを用いる Local Lymph Node Assay (以下 LLNA) が使用されている。LLNA は、化学物質をマウスの耳介に塗布し、耳介リンパ節で誘導されるリンパ球増殖を指標として化学物質の感作性の有無を判定する試験法であり、リンパ球増殖の定量に放射性同位元素 (RI) を用いる LLNA-RI 法 (OECD TG429、以下 LLNA-RI) のほか、プロモデオキシウリジン (BrdU) を用いる LLNA: BrdU-ELISA 法 (OECD TG442B、以下 LLNA: BrdU-ELISA) が公定化されている。リンパ球増殖の指標である Stimulation index (SI) が LLNA-RI では 3 以上、LLNA: BrdU-ELISA では 1.6 以上の場合、原則陽性 (区分 1) と判定する。また、SI が 3 又は 1.6 となるときの被験物質濃度 (EC3 値又は EC1.6 値) を算出することにより、感作性強度を推定することが可能であり、細区分は LLNA-RI で得られる EC3 値に基づき 1A (EC3 値 \leq 2%) 又は 1B (2% < EC3 値) と規定されている。一方で、放射性物質を用いない汎用的な手法である LLNA: BrdU-ELISA で得られる EC1.6 値による細区分基準は確立されていない。しかしながら、EC1.6 値について 2% に基づいて細区分した、基準の誤用事例が報告された。

そこで本研究では、LLNA: BrdU-ELISA の OECD TG 化に先立って実施された国際バリデーション研究データを再解析し、EC1.6 値に基づく最適な GHS 細区分基準を設定するとともに、現在国内で使用可能な汎用系統である CBA/J マウスを用いて代表的な感作性物質について LLNA: BrdU-ELISA を実施し、細区分基準の適用性を検証した。また、本細区分基準は 2025 年に OECD TG442B に収載され、現在 GHS 文書の収載に取り組んでいるのでその進捗も紹介する。

表 1 再解析に用いた感作性物質の細区分と EC3 値及び EC1.6 値

物質名	細区分	EC3 値 (%)	EC1.6 値 (%)
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	1A	0.009	0.065
<i>p</i> -Benzoquinone	1A	0.01	0.15
2,4-Dinitrochlorobenzene	1A	0.049	0.032
Diphenylcyclopropanone	1A	0.05	0.45
Glutaraldehyde	1A	0.083	0.115
1,4-Phenylenediamine	1A	0.11	0.285
Formaldehyde	1A	0.5	0.163
Cobalt(II) chloride	1A	0.66	0.316
4-Methylaminophenol sulfate	1A	0.8	1.081
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde	1A	1.4	1.53
Isoeugenol	1A	1.5	5.156
2-Mercaptobenzothiazole	1A	1.7	12.907
Cinnamic aldehyde	1A	1.9	4.808
3-Aminophenol	1B	3.2	2.99
Diethyl maleate	1B	3.6	8.049
Trimellitic anhydride	1B	4.7	0.862
Nickel sulfate	1B	4.8	1.027
4-Chloroaniline	1B	9	11.029
Sodium lauryl sulfate	1B	8.1	13.334
Citral	1B	9.2	7.143
α -Hexylcinnamaldehyde	1B	9.7	12.92
Eugenol	1B	10.1	8.851
Phenyl benzoate	1B	13.6	16.954
Cinnamic alcohol	1B	21	24.091
Cyclamen aldehyde	1B	22.3	41.496
Hydroxycitronellal	1B	24	13.636
Imidazolidinyl urea	1B	24	49.545
Ethylene glycol dimethacrylate	1B	28	31.751
Linalool	1B	30	27.596
Ethyl acrylate	1B	32.8	33.333
Isopropyl myristate	1B	44	9.44
Aniline	1B	47.5	73.596

2. 方法

2.1 EC1.6 値を用いた細区分基準の設定

2.1.1 解析方法

国際バリデーション研究において、当時汎用系統であった CBA/JN マウスを用いて取得された 32 物質（細区分 1A：13 物質、1B：19 物質）のデータを解析した（表 1）。任意の EC1.6 値を基準として 32 物質の細区分判定を行ったときの判定一致率を考慮し、最適な細区分基準を設定した。

2.1.2 解析結果と最適な判定基準

表 2 に、EC1.6 値=1~10%の任意の濃度を基準として細区分したときの判定一致率及び一致した物質数を示す。細区分 1A については、細区分基準を 6~10%としたときの一致率が 92.3%（12/13 物質）であり、最も高かった。6~10%の範囲における細区分 1B の一致率は、細区分基準が 6 又は 7%のとき、84.2%（16/19 物質）であった。したがって、EC1.6 値の細区分は 6 又は 7%を基準とすることが最適であると考えられた。ここでは、EC1.6 値=6%を細区分のための暫定基準とした。

表 2 任意濃度を細区分基準としたときの判定一致率及び物質数

細区分基準 (%)	細区分 1A	細区分 1B
1	61.5% (8/13)	94.7% (18/19)
2	76.9% (10/13)	89.5% (17/19)
3, 4	76.9% (10/13)	84.2% (16/19)
5	84.6% (11/13)	84.2% (16/19)
6, 7	92.3% (12/13)	84.2% (16/19)
8	92.3% (12/13)	78.9% (15/19)
9	92.3% (12/13)	73.7% (14/19)
10	92.3% (12/13)	68.4% (13/19)

2.2 CBA/J マウスにおける細区分判定基準の検証

2.2.1 実験方法

暫定基準の適用性を検証するため、現在国内で入手可能な汎用系統である CBA/J マウスを用い、LLNA の性能確認に使用される技能確認物質 15 物質を検証物質として OECD TG442B に従い LLNA: BrdU-ELISA を実施した。得られた SI から EC1.6 値を算出して、暫定基準に従い細区分判定を行った。また、汎用系統における暫定基準の妥当性を確認するため、得られた EC1.6 値と既知の EC3 値との相関解析を行った。

2.2.2 実験結果

表 3 に、各物質の細区分と得られた EC1.6 値及び暫定基準で判定した細区分結果を示す。EC1.6 値=6%を基準として判定した細区分結果は、全ての検証物質で既知の細区分

と一致した。また、CBA/J マウスにおける EC1.6 値は、既知の EC3 値と強い相関関係を示した ($r=0.9076$)。以上の結果から、EC1.6 値を用いた細区分判定基準は、汎用系統である CBA/J マウスに適用可能であることが示された。

表 3 検証物質の細区分と EC1.6 値及び細区分判定結果

物質名	細区分	EC1.6 値(%)	判定結果
<u>5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one</u>	1A	0.0095	1A
<u>2,4-Dinitrochlorobenzene</u>	1A	0.029	1A
<u>Cobalt(II) chloride</u>	1A	0.10	1A
<u>1,4-Phenylenediamine</u>	1A	0.22	1A
<u>Isoeugenol</u>	1A	1.3	1A
<u>2-Mercaptobenzothiazole</u>	1A	5.03	1A
<u>Eugenol</u>	1B	6.03	1B
<u>Imidazolidinyl urea</u>	1B	6.43	1B
<u>α-Hexylcinnamaldehyde</u>	1B	7.07	1B
<u>Cinnamic alcohol</u>	1B	10	1B
<u>Citral</u>	1B	11.7	1B
<u>Phenyl benzoate</u>	1B	24.3	1B
<u>Ethylene glycol dimethacrylate</u>	1B	28.18	1B
<u>Xylene</u>	1B	43.3	1B
<u>Methyl methacrylate</u>	1B	75	1B

下線：2.1 と共通の物質 (13 物質)

2.3 GHS 文書への収載に向けた取組み

2.1 及び 2.2 で得られた成果を基に、国連 GHS 小委員会に LLNA: BrdU-ELISA による細区分基準収載のための GHS 文書の改訂提案を行った。しかし、本基準が OECD TG442B に未収載であることから、改訂 10 版 (2023 年) では任意に適用可能な基準という補足的な付記に留まった。このため、OECD TG442B の改訂の提案を行うとともに再度 GHS 文書の改訂提案を行った。本基準は 2025 年に OECD TG442B に収載され、現在は GHS 文書改訂 12 版に正式な基準として収載されるよう議論を行っている。

3. まとめ

本研究により、実用的な LLNA: BrdU-ELISA による GHS 細区分基準を確立した。本基準は国連 GHS 文書への収載に向けて提案を行っており、2026 年 7 月に開催される GHS 小委員会において正式に承認された場合、2027 年発行の改訂 12 版に収載される予定である。