マウス局所リンパ節試験(LLNA)のための背景データ －陽性対照物質のEC3，媒体の適性および供試動物

森村智美，関　剛幸，高岡　裕，太田　亮

Back ground data for the Local Lymph Node Assay (LLNA) - the EC3 of positive control article, the suitability of vehicles and the animal strain for the experiment

Tomomi MORIMURA, Takayuki SEKI, Yutaka TAKAOKA, Ryo OHTA

マウス局所リンパ節試験(Local Lymph Node Assay: LLNA)は，1986年にKimberら[1)]によって提案された感作性試験法の一つであり，モルモットを用いた皮膚感作性試験の代替法として開発された．実験動物の3R(Replacement: 動物実験の代替，Reduction: 動物数の削減，Refinement: 苦痛を軽減する実験方法への改良)が問われる中，LLNAは，1999年に米国の代替法バリデーション省庁間調整委員会(ICCVAM)[2)]，食品医薬品局(FDA)などで受け入れられ，その後，世界的に広く認められるようになった．また，試験方法のハーモナイゼーションが進み，2002年に経済協力開発機構(OECD)でガイドライン化(TG 429)され[3)]，2010年には国際標準化機構(ISO)のガイドライン10993-10[4)]にも取り入れられた．日本国内では，LLNAは2012年3月に通知された医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンス[5)]に取り入れられた．

近年のLLNAガイドラインに対応するため，1)標準的な陽性対照物質に対する反応を確認する試験(陽性対照物質確認試験)，2)70%ジメチルスルホキシド(70% DMSO)および50%エタノールの媒体としての適性を検討する試験(媒体検討試験)，3)2011年より国内販売が開始されたCBA/Caマウスを用いた試験(動物検討試験)を行い，LLNAのための背景データを収集したので報告する．

材料および方法

1．陽性対照物質確認試験(実験1)

強い感作性物質であるジニトロクロロベンゼン(DNCB，CAS No. 97-00-7)は，モルモットを用いた皮膚感作性試験の陽性対照物質として使用されてきた歴史があり，秦野研究所ではLLNAの陽性対照物質としても使用してきた．しかし，LLNAのガイドラインの多くが，中程度の感作性物質であるヘキシルシンナムアルデヒド(HCA，CAS No. 101-86-0)を陽性対照物質の第一選択としている．そこで，LLNAの陽性対照物質をHCAへ移行することを前提に，HCAの秦野研究所における背景値を確認する試験を実施した．

HCA(和光純薬工業，大阪)の投与濃度はTG 429[6)]に記載されたEC3(後述)の許容範囲4.4～14.7%を基に5，10，25 w/v%とした．媒体もTG 429に従ってアセトン/オリブ油(4:1)混液(AOO)を選択し，媒体対照群を含む4群構成とした．試験は3回繰り返し行った．

投与方法はTG 429に従い，各投与検体を動物の左右耳介に25 μLずつ(1匹あたり50 μL)，1日1回，3日間連続投与した．投与の際，リングピンセットで耳介を広げ，マイクロピペットを用いて投与検体を塗布し，ドライヤー(冷風)で風乾した．

試験には，8週齢のCBA/J 系雌マウス(CBA/J，SPF動物，日本チャールス・リバー，神奈川)を使用した．動物数は1群5匹とし，検疫馴化期間最終日の体重を基に体重別層化無作為抽出法により群分けした．動物は，室温21~25℃，湿度40~75%，12時間明暗周期に調節された飼育室内で，床敷を敷いたケージ内に1群(5匹)ずつ収容し，固型飼料(CE-2，日本クレア，東京)および飲料水を自由摂取させて飼育した．なお，各試験は，動物の愛護および管理に関する法律を遵守し，秦

毒性部毒性学研究室

野研究所動物実験委員会の承認を受けて実施した.

全例の一般状態を動物飼育期間中毎日１回観察した. また, 全例の体重を実験第1(感作投与開始日)および第6日(屠殺, リンパ節摘出日)に測定した.

全例の放射活性を次の手順で個体別に求めた. リン酸緩衝生理食塩液(PBS, pH=7.4, 三菱化学メディエンス, 東京)で2.96 MBq/mLに希釈したトリチウム標識チミジン液(パーキンエルマージャパン, 神奈川)を, 最終感作投与の72±2時間後(実験第6日)に動物の尾静脈内に0.25 mLずつ投与した. 放射性化合物投与の5±0.75時間後, 動物を頸椎脱臼により安楽死させ, 両耳介リンパ節を摘出した. 摘出後, 3回目の試験ではリンパ節重量(左右計)を測定した. スライドグラスのフロスト部分を用い, 摘出したリンパ節の細胞をPBS 2 mL中に単離し, 細胞浮遊液(LNC)とした. LNCは, 注射筒(23Gの注射針付)に回収後, 遠心管に移した. 遠心分離(190×g, 10分間, 4℃)後に上清を吸引し, PBSを2 mL添加して攪拌する操作を2回繰り返してLNCを洗浄した. その後, 3回目の遠心分離を行い, 上清を吸引後, 5 w/v% トリクロロ酢酸(5 w/v% TCA)を3 mL加えてLNCを攪拌した. 攪拌後, LNCを冷蔵庫(2~8℃)内にて18±1時間静置した.

静置後, 遠心分離して上清を吸引し, 5 w/v% TCAを1 mL加えて沈殿物を懸濁させた. この懸濁液にシンチレーションカクテルを10 mL加えて混合して測定用の試料とした. 同様にブランク3本を用意した. 液体シンチレーションカウンター(Tri-Carb® 2910 TR, パーキンエルマー, Waltham, MA)を用いて1分間あたりの壊変数(DPM)を求めた. 求めた各試料のDPMからブランクのDPMの平均値を差し引き, 各動物の放射活性とした. リンパ節重量を測定した第3回目の試験では, 放射活性をリンパ節重量で除して放射活性の比リンパ節重量値を求めた.

得られた放射活性については, 各群の放射活性の平均値および標準偏差値を求めた. 次いで, 各濃度のHCA投与群の放射活性の平均値を媒体対照群の放射活性の平均値で除してSI(媒体対照群の放射活性を1とした場合の放射活性の比率)を算出した. EC3(SIが3を示す概算濃度)は線形補間法で算出した. すなわち, SIが3を上回る直近の濃度点をa, そのSIをb, 下回る直近の濃度点をc, そのSIをdとし, $EC3 = c + [(3-d)/(b-d)] \times (a-c)$の式に代入してEC3を算出した. なお, 放射活性, 放射活性の比リンパ節重量値およびリンパ節重量については, パラメトリックなDunnett型の片側検定により, 媒体対照群と各濃度のHCA投与群の平均値の差を検定した.

2. 媒体検討試験(実験2)

ISO 10993-10では, 感作性物質を用いるなどして, 媒体のバリデーションの実施を求めている. このことから, 既知の感作性物質を用いて媒体の適性を確認することにした.

1)70% DMSO

ジメチルスルホキシド(DMSO)はTG 429およびISO 10993-10に掲載されている媒体である. 100% DMSOは, 媒体単独でも刺激性による反応が生じ、放射活性が上昇することが知られているため[7,8], 秦野研究所では, 日本薬局方注射用水(注射用水)で希釈して70 vol% DMSO(70% DMSO)とすることで, 放射活性への影響がないことを確認している[9]. 今回は, この70% DMSOを媒体検討の対象とした. 感作性物質として, DMSOに溶解するHCA(5, 10, 25 w/v%)を選択し, 媒体対照群を含む4群構成で, 試験を3回繰り返し行った. 比較のため, 100% DMSOを媒体として媒体対照群および25 w/v% HCA投与群の2群を設定した試験を1回行った. なお, HCAは100% DMSOに溶解したが, 70% DMSOではいずれの濃度でも懸濁液となった. 投与方法, 使用動物, 試験操作, 観察および測定は, 実験1と同一条件で行ったが, SIが中用量群よりも低用量群で高値となった1回目の試験については, 最小二乗法により回帰直線を求め, 暫定的にEC3を求めた. また, 有意差検定では2群構成の場合, F検定を行い, 等分散の場合はStudentのｔ検定, 不等分散の場合にはAspin-Welchのｔ検定を行った. 第3回目の試験およびDMSOを媒体とした試験では9週齢の動物を使用した.

2)50%エタノール

エタノール/水混合液は, ISO 10993シリーズの試料の調製方法などを記したガイドライン

表1　CBA/Jマウスを用いたLLNAにおけるHCAのEC3確認試験

Item	Dose (w/v%)	Repetition of the same study		
		1	2	3
Test article		HCA	HCA	HCA
Vehicle		AOO	AOO	AOO
Age of animals at dosing (week)		8	8	8
Initial body weight (g)		21.6 ± 0.8	20.4 ± 1.4	21.5 ± 1.2
Number of animals/Group		5	5	5
Results				
Incorporated radioactivity[1] (dpm)	0	106 ± 71	420 ± 125	249 ± 144
	5	115 ± 14	578 ± 145	297 ± 79
	10	319 ± 123*	1342 ± 612*	827 ± 414
	25	695 ± 172**	3537 ± 798**	2303 ± 1486**
SI	5	1.1	1.4	1.2
	10	3.0	3.2	3.3
	25	6.6	8.4	9.2
EC3 (w/v%)		10.0	9.4	9.3
Absolute organ weights of auricular lymph node (mg)	0	−	−	5.1 ± 0.7
	5	−	−	5.6 ± 0.9
	10	−	−	6.7 ± 1.2
	25	−	−	8.3 ± 1.7**
Relative radioactivity[2] (dpm/mg)	0	−	−	47 ± 24
	5	−	−	53 ± 12
	10	−	−	120 ± 58
	25	−	−	265 ± 116**

平均 ± 標準偏差
−，検査せず
1) 放射活性(dpm)＝(各動物のdpm)−(ブランクのdpmの平均値)
2) 比リンパ節重量値(dpm/mg)＝放射活性(dpm)／耳介リンパ節の実重量(mg)
*, 媒体対照群に比べて有意に増加(p<0.05)
**, 媒体対照群に比べて有意に増加(p<0.01)

(ISO 10993-12)[10]に記載されている抽出媒体の一つである．LLNAでは，エタノール/水混合液の水の割合が高いほど皮膚への浸透性および付着性が低下し，媒体としての適性が下がると考えられる．このことから，使用する可能性のあるエタノール/水混合液のうち，最も濃度の低い50 vol%エタノール(50% エタノール)を媒体検討の対象とした．TG 429に示された感作性物質のうち，水に溶解する*p*-フェニレンジアミン(p-phenylenediamine: PPD，CAS No. 106-50-3)を選択した．群構成は媒体対照群を含む4群構成とした．PPD(和光純薬工業)の投与濃度は，TG 429に記載されたEC3の許容範囲0.07〜0.16%を基に0.05，0.1，0.25 w/v%としたが，試験を2回繰り返して行った時点で，反応が低いことが分かったため，3回目の試験では，0.1，0.25，0.5 w/v%とした．比較のため，TG 429に示されたPPDの媒体であるAOOを媒体として媒体対照群および0.25 w/v% PPD投与群の2群を設定した試験を1回行った．なお，PPDはいずれの媒体にも溶解した．投与方法，使用動物，操作，観察および測定は，実験1と同一条件で行ったが，有意差検定については実験2，1)70% DMSOと同一条件で行った．

3．動物検討試験(実験3)

試験には，8週齢のCBA/Ca系雌マウス(CBA/Ca，SPF動物，日本エスエルシー，静岡)を使用した．感作性物質は，実験1と同じHCAを選択し，投与濃度も実験1と同じ5，10，25 w/v%とした．また，媒体，投与方法，試験操作，観察および測定についても，実験1と同一条件で行った．

結果および考察

1．陽性対照物質確認試験(表1)

一般状態に変化は認められず，死亡例および切

表2-1　CBA/Jマウスを用いたLLNAにおける媒体（70% DMSO）の検討試験

Item	Dose (w/v%)	Repetition of the same study 1	2	3	Comparative study
Test article		HCA	HCA	HCA	HCA
Vehicle		70% DMSO	70% DMSO	70% DMSO	100% DMSO
Age of animals at dosing (week)		8	8	9	9
Initial body weight (g)		21.3 ± 0.9	22.5 ± 1.0	22.0 ± 1.0	21.5 ± 0.9
Number of animals/Group		5	5	5	5
Results					
Incorporated radioactivity[1)] (dpm)	0	181 ± 56	199 ± 120	169 ± 39	388 ± 112
	5	785 ± 618*	482 ± 94	421 ± 123*	−
	10	467 ± 182	682 ± 227	670 ± 176**	−
	25	1812 ± 111**	1128 ± 309**	2124 ± 884**	3446 ± 862**
SI	5	4.3	2.4	2.5	−
	10	2.6	3.4	4.0	−
	25	10.0	5.7	12.6	8.9
EC3 (w/v%)		7.0	8.0	6.7	−
Absolute organ weights of auricular lymph node (mg)	0	4.8 ± 0.5	4.8 ± 0.7	5.2 ± 1.0	6.3 ± 1.0
	5	6.2 ± 0.7*	5.9 ± 0.4	6.2 ± 0.5**	−
	10	6.7 ± 0.9**	6.0 ± 0.6**	7.5 ± 1.4**	−
	25	8.7 ± 0.8**	6.8 ± 0.7**	10.4 ± 1.3**	12.2 ± 2.1**
Relative radioactivity[2)] (dpm/mg)	0	38 ± 13	40 ± 18	33 ± 9	61 ± 12
	5	121 ± 88*	82 ± 17	76 ± 19*	−
	10	68 ± 19	112 ± 26*	89 ± 13**	−
	25	211 ± 23**	164 ± 38**	199 ± 63**	292 ± 95**

平均±標準偏差
−，検査せず
1) 放射活性(dpm)=(各動物のdpm)−(ブランクのdpmの平均値)
2) 比リンパ節重量値(dpm/mg)= 放射活性(dpm)/耳介リンパ節の実重量(mg)
*, 媒体対照群に比べて有意に増加(p<0.05)
**, 媒体対照群に比べて有意に増加(p<0.01)

迫屠殺例もなかった．体重が減少した個体は散見されたが，体重増加量は媒体対照群を含めて群間に差がなかった．リンパ節重量および放射活性の比リンパ節重量値は，1回目の試験を除きHCAの投与量の増加に伴って高値となる傾向にあった．

SIは各回とも用量依存的に増加し，EC3は，1回目10.0 w/v%，2回目9.4 w/v%，3回目9.3 w/v%となった．

3回の試験のEC3は，いずれもTG 429に示された許容範囲（4.4～14.7%）内にあり，ばらつきも少なかった．この結果からLLNAの陽性対照物質としてHCAを使用することに何ら問題はないと判断した．

2．媒体検討試験

1）70% DMSO（表2-1）

実験1同様，一般状態に変化はなく，体重増加に群間の差はなかった．リンパ節重量等も同様にHCAの投与量の増加に伴って高値となる傾向にあった．

SIは2回目および3回目では用量依存的に増加したが，1回目は10 w/v% HCA投与群よりも5 w/v% HCA投与群で高値となった．EC3は，1回目7.0 w/v%，2回目8.0 w/v%，3回目6.7 w/v%となった．

70% DMSO媒体時のHCAのEC3は，3回の試験ともTG 429の許容範囲内にあった．また，媒体対照群の放射活性の平均値は，100% DMSO（388 dpm）と比較して70% DMSOの方が低値（169～199 dpm）となり，媒体単独でも放射活性が高値を示すというDMSOの欠点[7,8)]が軽減されていた．一方で25 w/v% 投与群におけるSIは70% DMSO媒体時 で5.7から12.6となり，100% DMSO媒体時の8.9と比較して明らかな差はなかった．また，AOO媒体時と比較してEC3は同等または低かった（毒性が高く検出された）ことから，検出力に問題はなく，70% DMSO

表2-2　CBA/Jマウスを用いたLLNAにおける媒体(50％エタノール)の検討試験

Item	Dose (w/v%)	Repetition of the same study 1	2	3	Comparative study
Test article		PPD	PPD	PPD	PPD
Vehicle		50% Ethanol	50% Ethanol	50% Ethanol	AOO
Age of animals at dosing (week)		8	8	8	8
Initial body weight (g)		21.3 ± 1.3	21.3 ± 1.0	22.2 ± 1.0	22.3 ± 0.8
Number of animals/Group		5	5	5	5
Results					
Incorporated radioactivity[1)] (dpm)	0	92 ± 31	143 ± 81	113 ± 60	136 ± 60[3)]
	0.05	126 ± 56	193 ± 85	−	−
	0.1	121 ± 61	276 ± 251	248 ± 229	−
	0.25	402 ± 248**	375 ± 152*	302 ± 133	2236 ± 674**
	0.5	−	−	1190 ± 655**	−
SI	0.05	1.4	1.3	−	−
	0.1	1.3	1.9	2.2	−
	0.25	4.4	2.6	2.7	16.4
	0.5	−	−	10.5	−
EC3 (w/v%)		0.18	(>0.25)	0.26	−
Absolute organ weights of auricular lymph node (mg)	0	4.5 ± 0.6	4.8 ± 0.7	5.1 ± 0.8	4.8 ± 0.4[3)]
	0.05	5.0 ± 1.4	5.4 ± 0.7	−	−
	0.1	3.9 ± 1.4	5.3 ± 1.3	5.4 ± 1.0	−
	0.25	6.0 ± 1.4	6.4 ± 0.8*	6.1 ± 0.7	8.0 ± 0.7**
	0.5	−	−	7.1 ± 1.3**	−
Relative radioactivity[2)] (dpm/mg)	0	21 ± 8	29 ± 13	23 ± 12	29 ± 17[3)]
	0.05	25 ± 7	36 ± 13	−	−
	0.1	35 ± 26	49 ± 41	43 ± 32	−
	0.25	67 ± 35**	59 ± 24	50 ± 20	276 ± 59**
	0.5	−	−	161 ± 63**	−

平均±標準偏差
−，検査せず
1) 放射活性(dpm)＝(各動物のdpm)−(ブランクのdpmの平均値)
2) 比リンパ節重量値(dpm/mg)＝放射活性(dpm)／耳介リンパ節の実重量(mg)
3) 媒体対照群の1例でリンパ節の異常が認められたため、解析データから除外した。
*, 媒体対照群に比べて有意に増加(p<0.05)
**, 媒体対照群に比べて有意に増加(p<0.01)

はLLNAの媒体に適していると判断した．なお，AOO媒体時よりも放射活性のばらつきが大きく，SIが中用量群よりも低用量群で高値となる例が認められ，投与検体が懸濁液であったことが一因として考えられた．このことから，可能な限り懸濁液となる媒体は避けるか，懸濁液を使用する場合は，充分に混和するよう留意した方が良いと考えられた．

2)50％エタノール(表2-2)

実験1同様，一般状態に変化はなく，体重増加に群間の差はなかった．リンパ節重量等も同様にHCAの投与量の増加に伴って高値となる傾向にあった．

SIは各回とも用量依存的に増加し，EC3は，1回目0.18 w/v%，3回目0.26 w/v%となった．2回目は全ての群でSIが3を下回ったことから，EC3算出できなかったが，SIが用量依存的であったことから，0.25 w/v%以上であると推定した．

AOO媒体時，0.25 w/v% PPD投与群のSIは16.4となり，50％エタノールのSIが2.6から4.4であったことと比較して明らかに高い値を示した．

50％エタノールを媒体とした場合，各試験のEC3は，TG 429に示されたPPDのEC3の許容範囲0.07〜0.16％よりも高い濃度となった(毒性が低く検出された)．各回のSIに差はなく，再現性は問題ないと思われたが，EC3が許容範囲を僅かに上回ったこと，0.25 w/v% PPD投与

表3　LLNAにおけるCBA/Caマウスを用いた動物検討試験

Item	Dose (w/v%)	Repetition of the same study		
		1	2	3
Test article		HCA	HCA	HCA
Vehicle		AOO	AOO	AOO
Age of animals at dosing (week)		8	8	8
Initial body weight (g)		19.4 ± 0.8	19.0 ± 1.0	17.9 ± 0.7
Number of animals/Group		5	5	5
Results				
Incorporated radioactivity[1)] (dpm)	0	464 ± 105	287 ± 89	557 ± 120
	5	961 ± 455	401 ± 149	1317 ± 423
	10	1336 ± 387*	1103 ± 482	2173 ± 697**
	25	3879 ± 751**	4140 ± 1321**	5430 ± 1217**
SI	5	2.1	1.4	2.4
	10	2.9	3.8	3.9
	25	8.4	14.4	9.7
EC3 (w/v%)		10.3	8.3	7.0
Absolute organ weights of auricular lymph node (mg)	0	5.2 ± 0.4	5.1 ± 0.6	5.3 ± 0.4
	5	6.1 ± 0.5	5.9 ± 1.0	6.5 ± 0.9
	10	7.0 ± 1.3*	7.0 ± 0.6	7.7 ± 1.5**
	25	10.9 ± 1.5**	12.1 ± 3.6**	10.1 ± 0.9**
Relative radioactivity[2)] (dpm/mg)	0	88 ± 15	58 ± 19	106 ± 21
	5	154 ± 63*	66 ± 15	202 ± 50*
	10	187 ± 23**	161 ± 74*	276 ± 60**
	25	353 ± 35**	346 ± 87**	534 ± 70**

平均±標準偏差
1) 放射活性(dpm)=(各動物のdpm)−(ブランクのdpmの平均値)
2) 比リンパ節重量値(dpm/mg)= 放射活性(dpm)/耳介リンパ節の実重量(mg)
*, 媒体対照群に比べて有意に増加($p<0.05$)
**, 媒体対照群に比べて有意に増加($p<0.01$)

群のSIはAOO媒体時(16.4)と比べて50%エタノール媒体時(2.6〜4.4)に低かったことから，50%エタノールはやや検出感度が低い媒体であると推測された．ところで，LLNAの媒体を選択する場合，投与可能な最大濃度が溶解または懸濁できることが，重要となる．今回，EC3が許容範囲を外れたがその差は投与濃度の公比(約2)の範囲内であること，50%エタノールはTG 429およびISO10993-10で許容されている水系媒体に可溶化剤を添加する場合(やや検出感度が低いとの報告[7)]あり)と比べると投与部位への付着性は良いことから，AOOや70% DMSOを媒体として調製できない場合，やや感度が低いことを承知した上で50%エタノールを選択することも可能と考えた．また，エタノールの割合が高いほど，皮膚への浸透性および付着性が良いと考えられることから，エタノール/水混合液を媒体とする場合，エタノールは50%以上の濃度で可能な限り高くした方が良いと推察される．

3. 動物検討試験(表3)

実験1同様，一般状態に変化はなく，体重増加に群間の差はなかった．リンパ節重量等も同様に放射活性の上昇に伴って高値となる傾向にあった．なお，25 w/v% HCA投与群では，投与後数日，両耳介周辺に投与検体と思われる油様の被毛の汚れが散見された．

SIは各回とも用量依存的に増加し，EC3は，1回目10.3 w/v%，2回目8.3 w/v%，3回目7.0 w/v%となった．

CBA/Caを用いてHCAのEC3を求めた結果，3回ともTG 429のEC3の許容範囲内にあった．また，EC3は，CBA/Jの場合(**表1**)と差はなく，供試動物として問題ないと判断した．しかし，体重や媒体対照群における放射活性などの背景値は

CBA/Jと明らかに異なることから，単純にデータを比較することは難しいと考えた.

まとめ

今回の結果から，LLNA試験に用いるマウスは，CBA/J以外にCBA/Caも用いることが可能と判断した．また，LLNAに用いる媒体はAOOを基本とし，AOOへの溶解が困難な場合，第2選択として70% DMSOを検討することにした．この2媒体で溶解が困難な場合は，医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンス[5]に例示されているN,N-ジメチルホルムアミド(秦野研究所ではラウリル硫酸ナトリウムを用いて反応を確認，未発表)，100%エタノール，50%以上のエタノール/水混合液の順に検討することにした．また，ISOガイドライン[4,10]に従った2溶媒抽出の際にはAOOおよび70% DMSOを第1選択とし，試験試料の溶解, 変形等の問題が認められた場合は, 50%以上のエタノール/水混合液を媒体として検討することにした.

謝辞

今回の試験にご協力頂いた稲田浩子, 西垣嘉人, 青木聡子，安藤栄里子，松本亜紀の各氏に謝意を表します.

文献

1) 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

2) The murine local lymph node assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds. ICCVAM 1999; NIH Publication No. 99-4494

3) OECD guideline for the testing of chemicals, Test No. 429: Skin sensitization: local lymph node assay, 2002

4) Biological evaluation of medical devices- Part 10: Tests for irritation and skin sensitization (ISO 10993-10), 2010

5) 厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」，薬食機発0301第20号，2012

6) OECD guideline for the testing of chemicals, Test No. 429: Skin sensitization: local lymph node assay, 2010

7) Ryan CA, Cruse LW, Skinner RA, et al.: Examination of a vehicle for use with water soluble materials in the murine local lymph node assay. *Food Chem Toxicol.* 2002; **40**: 1719-1725

8) 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

9) 金澤由基子，志田勝彦，森村智美ら: マウスLocal lymph node assay (LLNA)における媒体選択: 第35回日本トキシコロジー学会学術年会2008年6月; 東京

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