特集

第78回日本衛生学会
メインシンポジウム1『職域および生活環境中の感作性物質を全ての人々に知ってもらおう』

動物による皮膚および呼吸器感作性試験の最近の動向

青山 公治

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科環境医学分野

Recent Development in Animal Testing to Predict the Skin and Respiratory Sensitizing Potential of Chemicals

Kohji AOYAMA

Department of Environmental Medicine, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, Kagoshima

Abstract The identification of chemicals with skin and/or respiratory sensitizing potential is important for the prevention of allergic diseases in both living and work environments. Although a number of animal models for respiratory allergic diseases have been reported, none of these models meets the goals of broad assessments of chemical sensitizing potential. We are attempting to develop a test for predicting the respiratory sensitization of chemicals. In the evaluation of skin sensitization of chemicals, the mostly used predictive tests are the guinea pig maximization test, Buehler test, and mouse local lymph node assay (LLNA). However, only LLNA has been validated formally and independently. Recent studies have revealed that EC3 estimated by LLNA correlates well with human skin sensitizing potency and the threshold for the induction of skin sensitization in the human repeat patch test. Thus, LLNA can predict the potency of skin sensitizing potential of a chemical and its risk in humans.

Key words: skin sensitization (皮膚感作性), respiratory sensitization (呼吸器感作性), animal testing (動物試験), risk assessment (リスク評価)

1. はじめに

感作性物質とは、生体に対しアレルギーを惹起する能力を有する物質をいう。アレルギーは、症状がまだ出現しない感作段階と症状が出現する誘発段階と、ふたつの局面を有する。感作段階は、特定のアレルギーとの反復曝露により、初期の免疫反応が開始し、やがて感作が成立する、いわゆる免疫学的記憶が成立することになる。誘発段階は、その後の特定のアレルギーの曝露により、過剰な免疫反応が誘発され、臨床症状が出現する。

我々を取り巻く生活・職場環境には、感作性物質が多

数存在している。そこで起きるアレルギー疾患の主要なものは、皮膚アレルギーおよび呼吸器アレルギーである。本稿では、それらを起こすアレルゲンを、それぞれ皮膚感作性物質および呼吸器感作性物質と呼ぶ。前者は皮膚との接触によりアレルギー性接触皮膚炎を起こす物質で、いわゆるⅣ型アレルギーを起こす物質であり、主に低分子化学物質である。一方、後者は、吸入によりアレルギー性の喘息や鼻炎など、Ⅰ型アレルギーを主体とする反応を起こす物質であり、高分子物質あるいは低分子化学物質である。

アレルギー疾患の増加に伴い、その予防対策が重要であるが、その優先すべき対策としてはまず抗原側の対策が必要である。そのためには、生活・職場環境中の物質についての正確でかつ適切な感作性の情報とその提供が不可欠である。しかし、これまで、その情報源の多くが長年にわたる臨床経験から得られたヒトの情報に依存してきた。予防医学的見地から、そのような健康問題が起きる前に、対策が講じられることが大切である。そのた

受付 2008 年 12 月 2 日, 受理 2009 年 3 月 16 日

Reprint requests to: Kohji AOYAMA

Department of Environmental Medicine, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan

TEL: +81(99)275-5291, FAX: +81(99)265-8434

E-mail: aoyama@m.kufm.kagoshima-u.ac.jp

めに、ヒトにおける感作性を予知できる動物を用いた感作性試験の開発が進められてきた。動物試験から得られる情報は、その物質の固有の性質としての感作性を評価しうる可能性が高く、ヒト由来の情報が得にくい量反応関係にもとづくリスク評価への有用性も期待される(1, 2)。したがって、動物試験を先行させて、感作性物質に対するリスク評価を行うことは、予防医学上極めて重要である。そこで、感作性評価のための動物試験とその有用性について最近の動向を述べる。なお、これまで開発されている試験法は、ほとんどが皮膚感作性を評価するための試験法であるので、本稿では主に皮膚感作性試験を中心に述べることにする。

2. 動物による感作性試験法

感作性試験法の開発の歴史は古く、70 年近くさかのぼる(3)。今日まで、皮膚感作性を評価する試験法の開発は精力的に行われ、現在、確立された数種の試験法が存在するが(4, 5)、呼吸器感作性については、未だ確立された試験法はない(6)。そこで、まず、皮膚感作性試験法について述べる。

1) 皮膚感作性試験

種々の皮膚感作性試験法が開発されており、化学物質の感作性の有無はもちろん、強度の評価が可能な試験法も近年開発されているので主な試験法を紹介する。

皮膚感作性試験法は、1940 年代から試験法の開発がなされており、これまで如何にヒトに類似する感作性を予測できるか、偽陰性を少なくするかに努力が払われてきた。現在、確立された数種の試験法のうち、OECD のガイドライン (TG406) に記載された試験法として、モルモットを用いた Guinea Pig Maximization Test (GPMT) (4, 7) と Buehler test (BT) (8, 7) があり、優れた皮膚感作性試験法として認知されている(9-11)。さらに、より定量的な皮膚感作性試験法として、マウスを用いた Local Lymph Node Assay (LLNA) (5, 12) が開発されている。

GPMT は、ヒトに類似する感作反応を示すとして従来から広く採用されてきた試験法で、Magunusson らにより開発された(4)。試験物質による感作処置として、アジュバントを用いた皮内注射と閉鎖塗布の併用が特徴である。また BT は、アジュバントは用いず、モルモットに対し繰り返し開放塗布のみで感作処置を行う方法であり、ヒトにおける曝露様式に近い感作処置が特徴である。いずれも、試験物質の塗布による惹起処置を行い、その皮膚反応をもって評価する。その他、OECD のガイドラインには記載されていないが、Draize Test(13)、Adjuvant and Patch Test(14)、および Split Adjuvant Test(15) 等が開発されている。OECD のガイドラインでは、mild/moderate の感作性物質は、試験が適切に行われた場合、アジュバントを用いる試験法では使用動物の 30% 以上の、アジュバントを用いない試験法では使用動物の 15% 以

上の陽性率が期待できるとされている(7)。

広く採用されてきたモルモットを用いた感作性試験 (GPT) も、評価法や社会的制約による問題点を指摘されている(16)。それらの問題点として、まず、試験物質の惹起濃度を刺激閾値以下の濃度に設定する必要があり、強い刺激性物質においては、濃度設定に制約があることや、皮内注射においては試験物質の本来の皮膚吸収を回避した経路となることが挙げられる。また、皮膚の惹起反応の評価は主観的になりやすいこと、感作並びに惹起濃度を考慮せず陽性率のみで評価するため定量的評価が困難であること、また、動物愛護の観点から、アジュバントを用いた皮内注射と長時間の閉鎖塗布による動物への苦痛や必要動物数が多いこと等が指摘されている。

GPT の問題を克服するために、マウスを用いた LLNA が最近開発された。GPT が惹起段階で感作性を評価するのに対して、LLNA は、感作段階で感作性を評価する方法である。感作処置による所属リンパ節の細胞増殖をエンドポイントとしている。OECD のガイドライン (TG429) に記載されている LLNA の手法を簡単に述べる(5)。まず、試験物質の 3 濃度段階を設定し、それぞれの濃度段階に動物群を用意する。マウスの耳介に 3 日間連続塗布し、惹起処置をすることなく、6 日目に ^3H -Methyl thymidine あるいは ^{125}I -deoxyuridine を尾静脈より注射し、5 時間後にリンパ節を摘出し、細胞浮遊液を作成し、ラジオアイソトープの取り込み量を測定する。対照群に対する比を取り、stimulation index (SI) 値とする。感作濃度と SI 値の間に量反応関係があるとともに、SI 値が 3 以上の場合に感作陽性とする(12, 17)。Basketter ら(18)は、さらに SI 値が 3 となる感作濃度、すなわち、対照群の 3 倍のリンパ節細胞の増殖を誘導するのに必要な感作濃度を Effective concentration 3 (EC3) 値として、これにより物質間の感作性の定量的な強度の比較を可能にしている(18, 19)。

感作性試験法の有用性としては、動物試験の結果がヒトの感作性を何処まで予測するかが最も重要となる。1997 年に Basketter らにより LLNA の妥当性評価の申請が、米国の実験動物代替法に関する政府研究機関の連合組織である Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) に提出され、その評価結果が公表された(20-22)。そこでは、ヒトの感作性データとして、ヒトの感作性試験である human maximization test (HMT) (23) や human repeated insult patch test (HRIPT) (24) による、限られた皮膚感作性物質についての実験的データベース(25, 26)が採用されている。これらのヒトのデータベースと LLNA あるいは GPT による感作性評価の比較と、両試験法間の評価の比較が行われ、感度、特異度、陽性予測率、陰性予測率および一致率の項目で評価された(22)。LLNA と GPMT/BT の間では 97 物質について評価され、感度 91%、特異度 83%、陽性予測率 93%、陰性予測率 80% および一致率 89% であった。一方、LLNA とヒトデータとの間では、74 物質

について感度 72%, 特異度 67%, 陽性予測率 96%, 陰性予測率 17% および一致率 72% であった。また, GPMT/BT とヒトデータとの間においてもほぼ同等の結果が得られた。これらの結果から, LLNA と GPMT/BT の評価はほぼ同等のレベルであり, また両者ともヒトの感作性をよく予知する方法であると判断された。さらに, LLNA は, 試験期間の短縮化や経費の低減化により多数の化学物質を同時評価できること, また, 使用動物数の減数に貢献できること, さらに, EC3 値を用いることにより, 皮膚感作性の相対的な強度をも定量的に評価できることなどがあげられた。数年間にわたる国際的な, 厳密な評価の後, LLNA は化学物質の評価のための推奨皮膚感作性試験として認識されるようになった (19)。現在, ヨーロッパにおける新しい化学物質の登録制度 (REACH) においても推奨されている (13)。

一方, LLNA がラジオアイソトープを使用することから, 試験法の実施に制約が多く, 施設によっては実施が不可能な場合がある。そこで, 最近, ラジオアイソトープを使用しないふたつの代替法が開発されつつある。いずれも所属リンパ節のリンパ節細胞の増殖をエンドポイントにしている点では LLNA と変わりはない。その指標として, ひとつは, 細胞の adenosine triphosphate (ATP) 量を測定する方法 (LLNA modified by Daicel (LLNA-DA)) であり (27, 28), 他方は 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) の取り込み量を測定する方法 (LLNA-BrdU) である (29, 30)。ここでは LLNA-DA について簡単に述べる。

試験物質をマウスの耳介に連続 3 日間の塗布後, 7 日目に再度 1 回塗布を実施する。但し, 各塗布の 1 時間前に 1% sodium lauryl sulfate (SLS) 塗布による前処置をしておく。8 日目に所属リンパ節の ATP 量を luciferin-luciferase 法にて測定する (27)。Idehara ら (28) は, ATP 量とリンパ節細胞数との相関性は高く, ATP 量は細胞増殖の指標として適切なエンドポイントであることを示している。彼らは, 31 の物質について, LLNA-DA にもとづく評価を行い, LLNA EC3 と LLNA-DA EC3 との良好な一致性を示しており, また, 文献的に得られた LLNA, GPT およびヒト試験法との比較を行い, その一致率はそれぞれ, 93, 80 および 79% であることを見出している。皮膚感作性評価のための信頼性の高い非ラジオアイソトープ代替法であると評価している (31)。

2) 呼吸器感作性試験

皮膚感作性物質に比べて, 呼吸器感作性を有する化学物質はそれ程多くは知られてはいないが, 化学物質による喘息や鼻炎で代表される呼吸器アレルギーが発症すると, 職業上あるいは生活上の重大な健康問題となる。皮膚感作性物質と同様に, 抗原側の予防対策として呼吸器感作性試験による予知は重要である。しかし, 現在, 広く認知され, 確立された呼吸器感作性試験法はない (32)。その一方, ヒトの呼吸器アレルギーの動物モデルの開発はこれまで精力的に行われてきており, 発症機序

の解明に大きな貢献を果たしてきた (33)。しかし, それらの多くの動物モデルは, 特定の抗原に対するヒトのアレルギー性炎症反応を部分的にしか再現しておらず, 広範な化学物質の感作性の評価に応えるためには, そのエンドポイントを評価できる包括的な指標を備えた試験法が必要である (34)。そのような観点から, 最近, 職業性の呼吸器感作性物質として知られる toluene diisocyanate (TDI) や trimellitic anhydride (TMA) 等を用いた, モルモットやマウスによる呼吸器感作性試験の開発の試みが進みつつある (6)。

モルモットは, ヒトと類似した気道反応性を示し, その検出が容易なことから, 多くの研究で使用されてきたが, 近交系が確立していないモルモットの免疫学的研究上の欠点は致命的であった (34)。そこで, 豊富な免疫学的情報を持つマウスを用いたモデルが開発されて, 細胞および分子レベルの作用機序に関する研究が促進されてきた。またマウスの呼吸器感作性物質に対する IgE 抗体産生, 肺炎症反応および気道過敏性を含む反応は, ヒトとの多くの類似性も示すことも有利な点である (35)。しかし, マウスでは惹起反応を検出しようとすると設備面で高いコストと技術が要求されるので, 最近, もっと簡便な呼吸器感作性を評価するための試みも行われている。皮膚及び呼吸器感作性物質による感作成立時に共通するリンパ節に着目し, LLNA 法を低分子量化学物質の呼吸器感作性評価の第一段階として用いることが検討されている (36, 37)。しかし, 経皮的な感作経路がリスク評価への研究発展の妨げとなる可能性が懸念される。

著者ならびに共同研究者は, 惹起段階での呼吸器感作性を評価する試験法の開発を目指し, これまでの呼吸器アレルギーの動物モデルについて, 採用されている感作・惹起方法および評価指標に着目し, 文献的レビューを試みた。PubMed をデータベースとして, asthma & animal & model & (guinea or mice) および asthma & animal & model & (TDI or TMA) のキーワードで検索した結果, 前者では 695 件, 後者では 33 件がヒットした (2007 年時点)。前者は, 約 90% が OVA 喘息モデルを使用したアレルギー疾患の病態解析・治療効果の評価を目的とした報告であり, 簡便で迅速なアレルゲンの投与法を採用した報告が多かった。感作経路は, 腹腔内投与によるものが 50% で, 吸入および鼻腔によるものがそれぞれ 30%, 8% であった。これに対し, 後者は, TDI および TMA の喘息動物の作成とその病態解明を目的とした報告であり, 皮膚塗布によるものが約 60% で, 鼻腔および吸入は, それぞれ 24%, 15% であった。本来, ヒトの曝露状況に類似した経気道系の投与法が適当と思われるが, 化学物質の刺激性による惹起反応への影響を考慮しつつ, より簡便な皮膚塗布が採用されたと思われる。惹起経路は, 両者とも吸入投与を主とする経気道がほとんどであった。惹起反応の評価項目は, 気管支肺胞洗浄 (BAL), 病理組織, サイトカイン解析あるいは呼吸反応との組み合わせが多く, 両者の大きな差異はみられなかったが, 後

者の方が組み合わせの項目数が多い傾向がみられた。Boverhofら (33) も、呼吸器感作性の評価では複数の評価項目を総合的に判断する必要性を示唆している。

著者らはこの文献的レビューを踏まえて呼吸器感作性試験のプロトコールを作成した。感作及び惹起方法は、吸入または鼻腔内投与あるいは気管内投与のいずれかとする。惹起反応の評価項目は、気管支肺胞洗浄液の細胞分画および病理組織検索を必須項目とし、かつ呼吸機能、抗体産生またはサイトカイン解析のうち、少なくともいずれかひとつの項目とする。感作対照群かつ惹起対照群を設ける。また陽性対照群として TDI または TMA を設ける。選択性のあるプロトコールであるが、今後の呼吸器感作性試験の開発促進を目指して、試験手法の一定の基準を示した。著者らは、さらに本プロトコールにもとづき、数種の既知の感作性物質について評価を試みた。感作および惹起処置は気管内直接投与とし、惹起反応の評価項目は、BAL, IgE および病理組織とした。感作処置は各試験物質の 3 段階濃度で、週 5 回の 3 週間、2 日間の休止後惹起処置を連日 3 日間行い、1 日の休息後解剖した。使用動物は BALB/c 系雌性マウス、8～11 週齢を用いた。試験物質として、水溶性タンパク質の OVA、呼吸器感作性物質の TDI と TMA、および皮膚感作性物質の DNCB を用いた。その結果、DNCB を除いて、各評価項目において呼吸器感作性の陽性反応が得られ、特に病理組織学的評価のスコアと感作濃度の関係に量依存性の関係が認められ、かつそれらの試験物質の相対的な感作強度を見出している (未発表)。

3. 動物による感作性試験にもとづく ヒトにおけるリスク評価の可能性

皮膚および呼吸器感作性物質の存在は、労働者や消費者にとって重大な健康問題である。感作性の情報をもとにそれらの物質を排除していくことが予防医学上最も効果的な対策である。しかし、感作性物質との接触が完全には避けられない場合は、多くの人々の被害を防止するために、定量的なリスク評価が必要となる (38)。そこで、動物による感作性試験のデータにもとづく、ヒトにおける皮膚感作性物質に対するリスク評価の可能性について述べる。

感作性のリスク評価において、感作性の特定の次なる段階は、感作性の強度と量反応関係の把握である。皮膚感作物質の感作性強度は物質間で大きく異なることから、相対的強度にもとづいてそれらを分類することは適切である。しかし、人における実験的データは今後得にくいことから、今後は動物のデータの利用が必須となる。そこで、ヒトにおける感作強度の相対的な評価における LLNA の EC3 値の有用性の検証が行われ、両者の間には密接な相関性が見出されている (39-41)。Basketter ら (39) は、20 種の化学物質についてヒトのデータベースにもとづく感作性強度と LLNA の EC3 値との整合性を検討し

た。ここでのヒトのデータベースとは、アレルギー性接触皮膚炎に関する長年にわたり蓄積された臨床的経験にもとづく臨床的データベースと、ヒトの感作性試験である HMT と HRIPT によって得られた実験的データベースである。その結果、ヒトの感作性の強度に応じて 5 クラスに分類された各化学物質群の EC3 値は、強度の高い群ではより低く、強度の低い群はより高いことを示した。また、Directive 67/548/EEC 指令 (欧州連合理事会にて制定された危険物の取扱いに関する通達) のもとに分類と表示の技術委員会の専門家グループにより動物による感作性試験データにもとづく感作強度の分類基準が示されている (41)。なお、感作強度にもとづく分類においては、ヒトでのデータから得られた感作性強度は、ヒトにおける皮膚感作試験にもとづくデータを除くと、種々の曝露要因に依存しているのに対し、動物試験から得られる感作性強度はその物質の本来の特性を示していること (1) に留意すべきである。

リスク評価には、さらに有害性の量反応関係が必要である。これまで、ヒトにおける感作及び惹起の閾値は、限られた物質ではあるがヒトの実験的感作性試験により確認されている (42-44)。今日ではヒトにおける感作性試験は、意図的に接触曝露する物質を除いては倫理上の問題で実施されていない。最近、3 つの研究グループが、ヒトの既存の感作性試験のデータをもとに、実験的に得られた皮膚感作の誘導閾値、すなわち HRIPT における無影響量 (NOEL) あるいは最小影響量 (LOEL) と LLNA の閾値、すなわち EC3 値との比較を試みている (2, 45, 46)。感作曝露要因として、強度とともに曝露面積あたりの dose が重要である (42, 47) ことから、いずれの研究でも感作濃度は処置部位の area dose ($\mu\text{g}/\text{m}^2$ あるいは $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) で示している。Schneider ら (45) は、57 種の物質について、それぞれの EC3 値と HRIPT の 5% 感作率の閾値 (DSA_{05}) との間の有意な相関関係を見いだしている。Griem ら (2) は、27 種の物質を対象にして同様な良好な相関関係を見いだしており、area dose で表した EC3 値はリスク評価のヒトの NOEL 代理値として使えるとしている。また Basketter ら (46) は、精度の高い HRIPT 閾値を得るために、適切な HRIPT の手法にもとづき実施された物質のみを研究の対象物質として、EC3 値と HRIPT 閾値との良好な相関関係を得ている。これらの研究は一定の曝露条件下での感作性物質の安全曝露レベルを示しており、LLNA の EC3 値からヒトの NOELs を直接予測する可能性を示唆している (48)。ただ、実際のリスク評価では、ヒトにおける種々の曝露要因や個体要因も考慮する必要があることは言うまでもない。

4. おわりに

本稿では、アレルギー疾患の抗原側の予防対策として、感作性の特定が重要であることから、動物による感作性試験の動向について概説した。呼吸器感作性試験法はま

だ確立された方法がないことからその現状と著者らの試みを紹介した。一方、皮膚感作性試験においては、正式な妥当性評価も受け、現在国際的に最も推奨されている LLNA を紹介した。この LLNA により、ヒトにおける感作性の特定、感作性の相対的強度の評価、さらには感作閾値の設定も可能な状況になってきた。動物による感作試験法にもとづく、感作性物質のリスク評価も現実味を帯びてきたと言える。これらの研究に対する既存のヒトにおける皮膚感作性試験データ等の貢献度は大きい。今後、呼吸器感作性試験においても皮膚感作性試験と同様な優れた試験法の開発が期待されるが、呼吸器感作性物質に関するヒトの量反応関係に関するデータが皮膚感作性物質に比べてはるかに得にくく少ない。感作性物質にかかわる疫学的研究データの組織的な収集体制の構築が望まれる。

謝 辞

本稿の執筆の背景となった研究の共同研究者であるダイセル化学工業 (株) 評価解析センターの山下邦彦氏、出原賢治氏、山岸学氏、元ダイセル化学工業 (株) の上森健至氏および鹿児島大学大学院医歯学総合研究科教授竹内亨先生に深謝致します。

文 献

- (1) Kimber I, Basketter DA, Berthold K, Butler M, Garrigue JL, Lea L, Newsome C, Roggeband R, Steiling W, Stropp G, Waterman S, Wiemann C. Skin sensitization testing in potency and risk assessment. *Toxicol Sci.* 2001;59:198-208.
- (2) Griem P, Goebel C, Scheffler H. Proposal for a risk assessment methodology for skin sensitization based on sensitization potency data. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2003;38:269-290.
- (3) Landsteiner K, Chase MW. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. IX. Skin sensitization induced by injection of conjugates. *J Exp Med.* 1941;73:431-438.
- (4) Magnusson B, Kligman AM. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J Invest Dermatol.* 1969;52:268-276.
- (5) Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for testing of chemicals No. 429. Skin sensitisation: Local lymph node assay. 2002. Available at: <http://www.oecd.org>
- (6) Arts JHE, Mommers C, de Heer C. Dose-response relationships and threshold levels in skin and respiratory allergy. *Crit Rev Toxicol.* 2006;36:219-251.
- (7) Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for testing of chemicals No. 406. Skin sensitisation. 1992. Available at: <http://www.oecd.org>
- (8) Buehler EV. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Arch Dermatol.* 1965;91:171-177.
- (9) Wahlberg JE, Boman A. Guinea pig maximization test. *Curr Probl Dermatol.* 1985;14:59-106.
- (10) Botham PA, Basketter DA, Maurer T, Mueller D, Potokar M, Bontinck WJ. Skin sensitization—a critical review of predictive test methods in animals and man. *Food Chem Toxicol.* 1991;29:275-286.
- (11) Frankild S, Volund A, Wahlberg JE, Andersen KE. Comparison of the sensitivities of the Buehler test and the guinea pig maximization test for predictive testing of contact allergy. *Acta Derm Venereol.* 2000;80:256-262.
- (12) Kimber I, Basketter DA. The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. *Food Chem Toxicol.* 1992;30:165-169.
- (13) Draize JH. Dermal toxicity. *Food Drug Cosmetol Law J.* 1955;10:722-732.
- (14) Sato Y, Katsumura Y, Ichikawa H, Kobayashi T, Kozuka T, Morikawa F, Ohta S. A modified technique of guinea pig testing to identify delayed hypersensitivity allergens. *Contact Dermatitis.* 1981;7:225-237.
- (15) Maguire HC. Alteration in the acquisition of delayed hypersensitivity with adjuvant in the guinea pig. *Monogr Allergy.* 1974;8:13-26.
- (16) Basketter DA, Gerberick GF, Kimber I, Loveless SE. The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitization tests. *Food Chem Toxicol.* 1996;34:985-997.
- (17) Basketter DA, Lea LJ, Cooper K, Stocks J, Dickens A, Pate I, Dearman RJ, Kimber I. Threshold for classification as a skin sensitizer in the local lymph node assay: a statistical evaluation. *Food Chem Toxicol.* 1999;37:1167-1174.
- (18) Basketter DA, Lea LJ, Dickens A, Briggs D, Pate I, Rebecca J, Dearman RJ, Kimber I. A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. *J Appl Toxicol.* 1999;19:261-266.
- (19) Gerberick GF, Ryan CA, Dearman RJ, Kimber I. Local lymph node assay (LLNA) for detection of sensitization capacity of chemicals. *Methods.* 2007;41:54-60.
- (20) Sailstad DM, Hattan D, Hill RN, Stokes WS. ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay I. The ICCVAM review process. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2001;34:249-257.
- (21) Dean JH, Twerdok LE, Tice RR, Sailstad DM, Hattan DG, Stokes WS. ICCAM evaluation of the murine local lymph node assay II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2001;34:258-273.
- (22) Haneke KE, Tice RR, Carson BL, Margolin BH, Stokes WS. 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. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2001;34:274-286.
- (23) Kligman AM. The identification of contact allergens by human assay. III. The maximization test: a procedure for screening and rating contact sensitizers. *J Invest Dermatol.* 1966;47:393-409.
- (24) Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study

- of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1944;82:377-390.
- (25) Marzulli FN, Maibach HI. Contact allergy: predictive testing of fragrance ingredients in humans by Draize and Maximization methods. *J Environ Pathol Toxicol.* 1980;3:235-245.
- (26) Marzulli FN, Mainbach HI. The use of graded concentrations in studying skin sensitizers: experimental contact sensitization in man. *Food Cosmet Toxicol.* 1974;12:219-227.
- (27) Yamashita K, Idehara K, Fukuda N, Yamagishi G, Kawada N. Development of a modified local lymph node assay using ATP measurement as an endpoint. *AATEX.* 2005;11:136-144.
- (28) Idehara K, Yamagishi G, Yamashita K, Ito M. Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2008;58:1-10.
- (29) Takeyoshi M, Yamasaki K, Yakabe Y, Takatsuki M, Kimber I. Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyridine (BrdU) incorporation. *Toxicol Lett.* 2001;119:203-208.
- (30) Takeyoshi M, Noda S, Yamasaki K, Kimber I. Advantage of using CBA/N strain mice in a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J Appl Toxicol.* 2006;26:5-9.
- (31) Omori T, Idehara K, Kojima H, Sozu T, Arima K, Goto H, Hanada T, Ikarashi Y, Inoda T, Kanazawa Y, Kosaka T, Maki E, Morimoto T, Shinoda S, Shinoda N, Takeyoshi M, Tanaka M, Uratani M, Usami M, Yamanaka A, Yoneda T, Yoshimura I, Yuasa A. Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2008;58:11-26.
- (32) Kimber I, Agius R, Basketter DA, Corsini E, Cullinan P, Dearman RJ, Gimenez-Arnau E, Greenwell L, Hartung T, Kuper F, Maestrelli P, Roggen E, Rovida C. Chemical respiratory allergy: Opportunities for hazard identification and characterisation. The report and recommendations of ECVAM Workshop 60. *ATLA.* 2007;35:243-265.
- (33) Boverhof DR, Billington R, Gollapudi BB, Hotchkiss JA, Krieger SM, Poole A, Wiescinski CM, Woolhiser MR. Respiratory sensitization and allergy: Current research approaches and needs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;226:1-13.
- (34) Pauluhn J, Mohr U. Experimental approaches to evaluate respiratory allergy in animal models. *Exp Toxicol Pathol.* 2005;56:203-234.
- (35) Epstein MM. Are mouse models of allergic asthma useful for testing novel therapeutics? *Exp Toxicol Pathol.* 2006;57:41-44.
- (36) Dearman RJ, Kimber I. Cytokine fingerprinting: Characterization of chemical allergens. *Methods.* 1999;19:56-63.
- (37) Arts JHE, Kuper CF. Animal models to test respiratory allergy of low molecular weight chemicals: A guidance. *Methods.* 2007;41:61-71.
- (38) Menne T, Wahlberg JE. Risk assessment failures of chemicals commonly used in consumer products. *Contact Dermatitis.* 2002;46:189-190.
- (39) Basketter DA, Balikie L, Dearman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, Evans P, White IR, Rycroft RJ. Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis.* 2000;42:344-348.
- (40) Gerberick GF, Robinson MK, Ryan CA, Dearman RJ, Kimber I, Basketter DA, Wright Z, Marks JG. Contact allergenic potency: Correlation of human and local lymph node assay data. *Am J Contact Dermatitis.* 2001;12:156-161.
- (41) Basketter DA, Andersen KE, Liden C, Loveren HV, Boman A, Kimber I, Alanko K, Berggren E. Evaluation of the skin sensitizing potency of chemicals by using the existing methods and considerations of relevance for elicitation. *Contact Dermatitis.* 2005;52:39-43.
- (42) White SI, Friedmann PS, Moss C, Simpson JM. The effect of altering area of application and dose per unit area on sensitization by DNCB. *Br J Dermatol.* 1986;115:663-668.
- (43) Friedmann PS. The immunology of allergic contact dermatitis: the DNCB story. *Adv Dermatol.* 1990;5:175-195.
- (44) Boukhman MP, Maibach HI. Thresholds in contact sensitization: Immunologic mechanisms and experimental evidence in humans—an overview. *Food Chem Toxicol.* 2001;39:1125-1134.
- (45) Schneider K, Akkan Z. Quantitative relationship between the local lymph node assay and human skin sensitization assays. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2004;245-255.
- (46) Basketter DA, Clapp C, Jefferies D, Safford B, Ryan CA, Gerberick F, Dearman RJ, Kimber I. Predictive identification of human skin sensitization thresholds. *Contact Dermatitis.* 2005;53:260-267.
- (47) Rees JL, Friedmann PS, Matthews JN. The influence of area of application on sensitization by dinitrochlorobenzene. *Br J Dermatol.* 1990;122:29-31.
- (48) Basketter DA. Skin sensitization: strategies for the assessment and management of risk. *Br J Dermatol.* 2008;159:267-273.