

		赤血球試験		
		陽性 (10 ≤ L)	擬陽性 (5 ≤ L < 10)	陰性 (L < 5)
酵母試験	陽性 (5 ≤ Z)	陽性	陽性	陽性
	擬陽性 (2 ≤ Z < 5)	陽性	擬陽性	擬陽性
	陰性 (Z < 2)	陽性	擬陽性	陰性

4. 結果の要約

実験で得られたデータは、計画書に従ってデータ解析担当者に送られ、解析された。

その詳細は「データ解析報告書 ver1.2, 一部 ver 1.21 と ver 1.22」(資料(5)参照)の通りである。以下の説明はこの報告書を要約したものであるから、細部を確かめたいときはこれを参照していただきたい。

4-1) 酵母試験の施設内再現性と施設間再現性

図 1, 図 2 は各施設の酵母試験の陽性対照の阻止帯の差の分布である。図 1 が前研究, 図 2 が本研究の結果である。

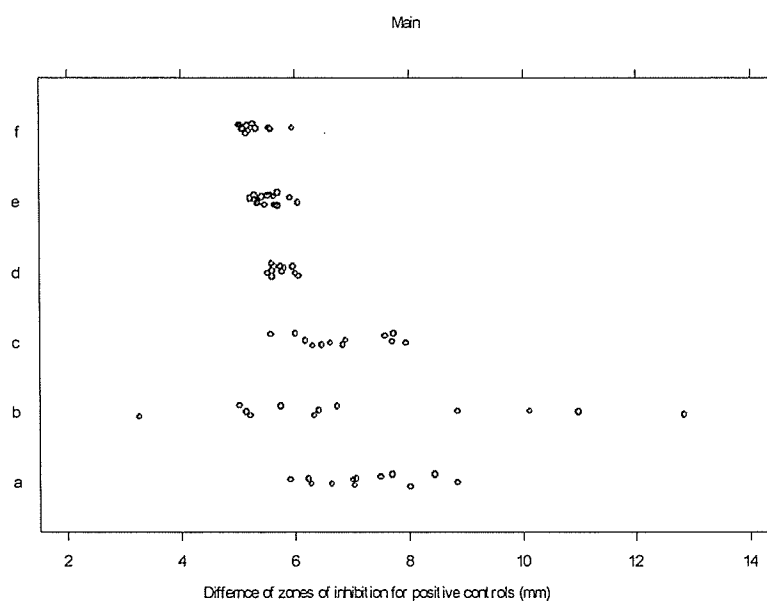


図 1 前研究における酵母試験の陽性対照の阻止帯の差

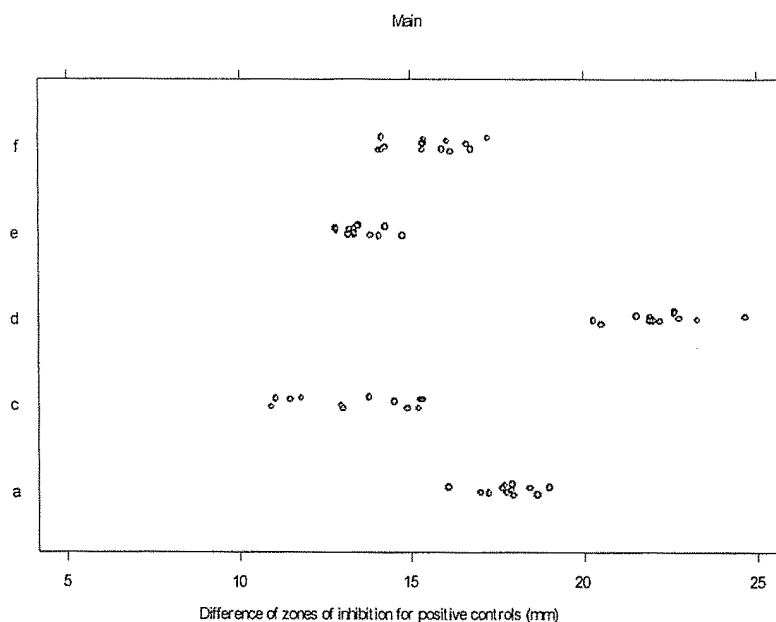


図2 本研究における酵母試験の陽性対照の阻止帯の差

酵母試験では、阻止帯の差が5mm以上となったときに陽性と判定される。前研究に比べて本研究では、すべての施設で阻止帯の差が10mmを大きく上回っていることから、陽性対照物質で明確に陽性と判定できることになったといえる。

施設内でのばらつきは、前研究に比べて本研究の方が大きくなった。これは、阻止帯の長さをより長い方に伸ばすことになったため、阻止帯の差のばらつきを大きくする傾向を生み出し、結果として施設間で大きなばらつきを生じさせたためと考えられる。

表3、表4は酵母試験における各被験物質の判定結果を要約したものである。表3が前研究、表4が本研究の結果である。

表3 前研究での酵母試験の施設間再現性 (P: 陽性, E: 擬陽性, N: 陰性)

被験物質	コード	In vivo 判定	施設					
			A	b	c	d	e	f
アントラセン	A	P	P	G	G	G		
アミオダロン	B	P	P	N	P	G		
クロルヘキシジン	C	N	E	N	N	N		
クロルプロマジン	D	P	P	N			E	N
ピチオノール	E	N	P	E			E	E
SLS	F	N	N	N			N	N
アクリジン	G	P			P	E	E	E
6-メチルクマリン	H	N			N	E	E	E
Parsol 1789	I	N			N	N	N	N

表4 本研究での酵母試験の施設間再現性 (P: 陽性, E: 擬陽性, N: 陰性)

被験物質	コード	In vivo 判定	施設				
			a	C	d	e	F
アントラセン	A	P	P	P	P		
アミオダロン	B	P	P	P	P		
クロルヘキシジン	C	N	N	N	N		
クロルプロマジン	D	P	P			P	P
ピチオノール	E	N	E			N	P
SLS	F	N	N			N	E
アクリジン	G	P		P	P	P	P
6-メチルクマリン	H	N		E	N	P	P
Parsol 1789	I	N		N	N	N	N

4-2) 酵母-赤血球試験における施設間再現性および *in vivo* 判定との類似性

図 3 は施設ごとの酵母試験における阻止帯の差を縦軸に、赤血球試験 (540nm) における溶血度の差を横軸としたグラフである。

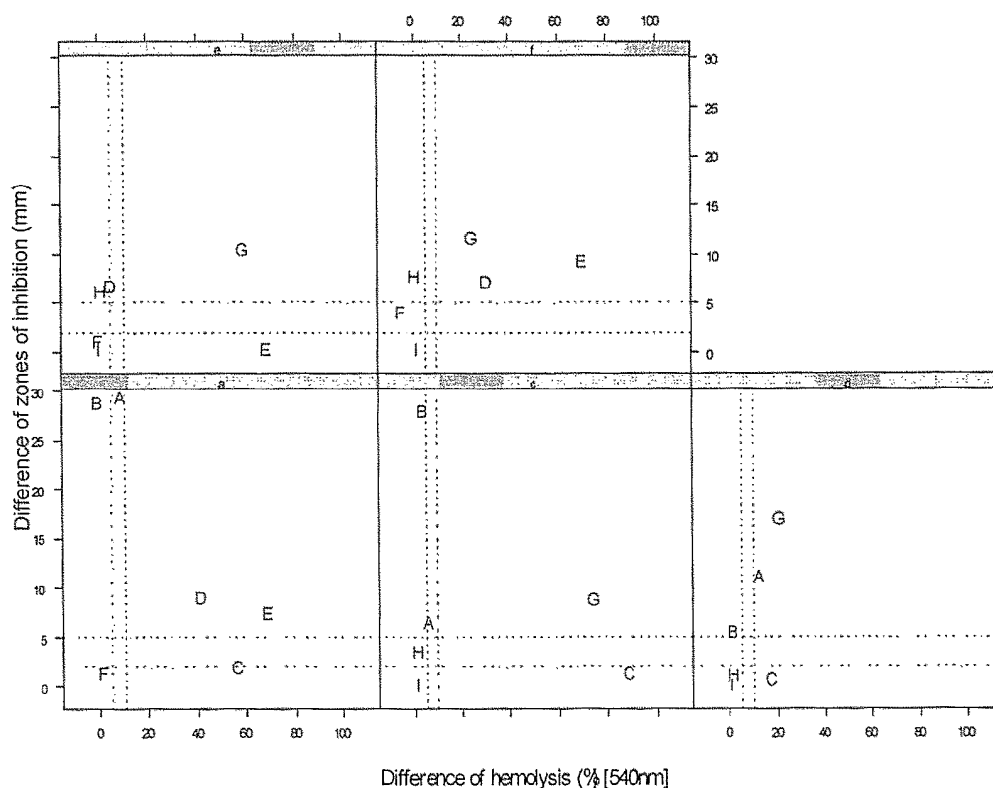


図 3 本研究における酵母試験の阻止帯の差と赤血球試験の溶血度の差

縦軸である酵母試験の結果をみると、陽性と判定された物質 A (アントラセン) や物質 B (アミオダロン) では施設間差がみられたが、陰性と判定された物質物質 C (クロルヘキシジン)、物質 I (Parsol 1789) などには、大きな施設間差がみられなかった。

表 5 は酵母－赤血球試験における施設間再現性の検討結果を要約したものである。

表 5 施設間再現性 (P : 陽性, E : 擬陽性, N : 陰性)

被験物質	コード	In vivo 判定	施設				
			a	C	D	E	F
アントラセン	A	P	P	P	P		
アミオダロン	B	P	P	P	P		
クロルヘキシジン	C	N	P	P	P		
クロルプロマジン	D	P	P			P	P
ピチオノール	E	N	P			P	P
SLS	F	N	N			N	E
アクリジン	G	P		P	P	P	P
6-メチルクマリン	H	N		E	N	P	P
Parsol 1789	I	N		N	N	N	N

表 6 は酵母－赤血球試験の判定と In vivo での判定との類似性を示している。採用している指標は次の通りである。

感度 I : 陽性物質を陽性と判定した割合

感度 II : 陽性物質を陽性または擬陽性と判定した割合

特異度 : 陰性物質を陰性と判定した割合

一致度 : In vivo 判定と判定が一致した割合

注 : 感度 I と感度 II の値が同じだったので、特異度については両者を区別しなかった。

表 6 In vivo 判定に対する実験判定の類似性 (540nm)

	施設コード					平均
	A	C	d	E	f	
感度 I	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	13/13 (100%)
感度 II	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	13/13 (100%)
特異度	1/3 (33%)	1/3 (33%)	2/3 (67%)	2/4 (50%)	1/4 (25%)	8/17 (42%)
一致度	4/6 (67%)	4/6 (67%)	5/6 (83%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	18/30 (60%)

すべての施設 (3 または 4 施設) で判定が陽性となった陰性物質は 2 物質 (物質 C : クロルヘキシジン, 物質 E : ピチオノール) で、前研究の 2 物質と同じであった。図 3 からわかるように物質 C は、本研究で実施された酵母試験で陰性と判定されているので、陽性判定は赤血球光溶血試験のためである。

5. 考察

5-1) SOP 改訂の陽性対照に関する影響

SOP 改訂は、陽性対照を確実に陽性対照と判定することに焦点を合わせて行われた。その結果、すべての施設で陽性対照が陽性判定となった。改訂の妥当性が確認できたと考えられる。しかしこのことは、阻止帯の長さをより長い方に伸ばすことになったため、阻止帯の差のばらつきを大きくする傾向を生み出し、結果として施設間で大きなばらつきを生じさせたと考えられる。

5-2) 被験物質による SOP 改訂の影響の違い

物質 A (アントラセン) や物質 B (アミオダロン) などの陽性物質では施設間差がみられたが、陰性と判定された物質には、大きな施設間差がみられなかった。SOP 改訂が、陽性判定をより明

確に出そうとしたものであったため、阻止帯の差のばらつきを大きくしたと考えられる。

5-3) 阻止円の測り方

中間報告会の討論において、実験担当者から、技術研修で指導された阻止円の測り方を SOP に文章として書いておいた方がよい、という意見が出された。プレートの底まで円が貫通しているものと表面だけに円が見られるものがあったためである。この点が明確でなかったことがばらつきの一要因になっていることが考えられる。試験法の提案者からは、今後 SOP を改定する場合には、「阻止帯の外径を測るときは、表面に着目することとして、プレート裏面まで突き抜けるような十分に深いものでなくてもよいし、輪郭が不明瞭なものでもよいとする。輪郭が不明瞭な場合は最も外側を測定することとする」との記載を追記したいとの案が示された。

5-4) 酵母試験での施設間差

物質 E (ピチオノール), 物質 F (SLS), 物質 H (6-メチルクマリン) は施設によって酵母試験の判定が異なったが、阻止帯の差の値に極端に大きな違いはなかった。改訂 SOP の下でも、酵母試験は、これら 3 物質で得られた程度の施設間差がある試験法と考えられる。

6. まとめ

6-1) SOP 改訂により、陽性対照の判定はすべての施設で陽性判定となった。この面では SOP 改訂の妥当性はあったと考えられる。

6-2) バッテリーシステムでの判定は、感度 I, 感度 II ともに 100%であった。SOP 改訂によって、前研究では擬陽性領域にあった物質に陽性判定が下されたためである。

6-3) 陽性物質の阻止帯の差の施設間差はやや大きくなった。SOP 改訂の一つの結果と考えられる。

6-4) すべての施設 (3 または 4 施設) で、バッテリーシステムでの判定と In vivo の結果が一致したのは 9 物質中 4 物質で、前研究の 2 物質より多かった。これも SOP 改訂の結果である。

6-5) すべての施設 (3 または 4 施設) で判定が陽性となった陰性物質は 2 物質 (物質 C: クロルヘキシジン, 物質 E: ピチオノール) で、前研究と同じであった。

以上

付録1 バリデーション委員会への要請

日本動物実験代替法学会
バリデーション委員会 委員長
吉村 功先生

別添資料（060615）のごとく、本学会評価委員会委員長の大野泰雄先生より「酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験を用いた光毒性試験バッテリーの評価」に関して、学会長宛に2次評価の結果の報告がなされ、本日受理いたしました。

つきましては、貴委員会において、その妥当性検証のためのバリデーション試験を実施され、その妥当性をご検討下さいますようお願い申し上げます。

平成18年6月16日

日本動物実験代替法学会
会長 田中 憲穂

CC: 黒澤副会長、小島庶務幹事、大野評価委員長、学会事務局

付録2 実験計画書

光毒性試験代替法補完実験計画書

2006年7月4日 作成者 吉村功

2006年7月14日 改訂責任者 吉村功

0. まえおき

本研究は、日本動物実験代替法学会（本学会）バリデーション委員会が、実行委員会を組織して行うものである。研究遂行中に計画を変更したときは、その度ごとに改訂日、改訂内容、改訂責任者を記録する。

1. 研究目的

2003年から2004年にかけて行われた酵母光生育阻害試験（酵母試験）と赤血球光溶血性試験（溶血試験）の組み合わせ（試験バッテリー）の多施設バリデーション研究（前実験）において、酵母試験のSOPの不備が指摘された。試験バッテリーの提案者は、2006年5月にSOPの改訂を行った。その改訂の妥当性を検証するための実験（補完実験）を行い、改訂後の試験バッテリーの適用における施設間差を評価することが本研究の目的である。

2. 実行組織

補完実験を行う組織の正式名称を「酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会」として、略称を「補完実験実行委」とする。

メンバーは次の11人で、その連絡先は添付資料1の通りである。

1) 実験参加施設代表：

板垣宏（資生堂）、岡本裕子（コーセー）、長谷川靖司（メナード）、田中憲穂（食薬センター）、土肥孝彰（マルホ）

2) バリデーション委員会委員

大森崇（京都大）、吉村功（理科大、本実行委の委員長）

3) 技術担当：

穂谷昌利、石川牧恵（資生堂）、小島肇（国立衛研）、石川公平（理科大）

3. 研究日程

2006年7月4日に、第1回補完実験実行委員会を開催し、参加施設、実行委員、実験担当者、実行委員長を確定し、改定SOPと補完実験計画書を確認した。

7月14日までに、試料と校正した強度計を各施設に配送する。

9月16日までに各施設が実験を行う。実験担当者は実験終了後可及的速やかに、データを大森、石川公平、吉村に送付し、GLP準拠の関連資料のコピーを大森に送付する。

10月中旬に中間報告会を開催する。

12月末までに報告書をまとめる

4. 実験参加施設

実験参加施設は次の5施設である。

(株)コーセー研究本部品質保証センター（実験担当者：今井教安）

(株)資生堂品質保証センター（実験担当者：石川牧恵）

(財)食品薬品安全センター秦野研究所（実験担当者：若栗忍）

日本メナード化粧品（株）総合研究所（実験担当者：松永康明）

マルホ（株）京都R&Dセンター（実験担当者：米澤理一郎）

5. 被験物質

各施設で実験する被験物質は前実験と同じであるが、薬物コードは異なったものとする。配布は小島（国立衛研）が行う。実験担当者は被験物質の使用、保管、廃棄すべての段階において、

それらを劇物として取り扱い、必要な記録を保管しなければならない。

6. 機器、消耗品と被験物質試料の準備

光源は、Dr. Hönle 社の SOL500 とする。強度計は小島が校正する。

資生堂（神奈川）自社の光源

食薬研（神奈川）自社の光源

マルホ（京都）自社の光源

コーセー（東京）研究班の光源 1

メナード（名古屋）研究班の光源 2

マイクロプレート、ペーパーディスク、酵母の手配は、共通消耗品は小島が配布する。

測定機器、実験条件で必要と思われることは各実験施設で記録を保管し、解析の際に問い合わせがあったら報告する。

7. 経費

本学会バリデーション委員会委員以外の旅費は実験参加施設等の自弁とする。

補完実験実行委が送付するもの以外の実験上の消耗品は各施設で自弁とする。

8. データの管理と解析

実験を行ったらできるだけ早く、結果を指定データシートに記入して、電子ファイルをメールで大森、石川公平、吉村に送付する。各種記録用紙（GLP 準拠関連資料も含む）のコピーは「〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町 京都大学大学院医学研究科医療統計 大森崇助教授」に送付する。

報告されたデータは石川公平が点検し、疑問点を施設に確認し、必要な修正を行ったところでデータベースに固定する。

9. 検討会

一応のデータ解析ができた段階で、実行委員と実験担当者全員の参加の下で、固定されたデータの確認と解析結果の検討を行うための会合を開く。

10. 結果の公表

2006 年 12 月末までに結果を厚生労働科学研究班の報告にする。

全体の結果は、厚生科学研究班報告書、学会報告、学術論文として公表する。公表の際の著者名については、検討会で確定する。

11. 各種問い合わせ先

実験内容についての疑問は、石川牧恵に問い合わせること。

被験物質、試料、共通消耗品についての疑問は、小島に問い合わせること。

データシートについての疑問は、石川公平に問い合わせること。

報告書、データの送付、研究の遂行についての疑問は、吉村に問い合わせること。 以上

=====
改訂内容（敬称略）

2006 年 7 月 14 日の改訂

ワープロミス・文章ミスの修正以外の、本質的な改訂部分と改訂理由は次の通りである。

1. 所属・氏名等：石川牧恵、小島肇等から、誤りの修正要求があったので改訂した。（添付資料の名簿部分にも改訂が及んでいる。）
2. 本実行委の委員長：2-2) において、「委員長」と書かれていたところを「本実行委の委員長」とした。委員長が誰であるか明記しておいた方がよい、という注意を受けたためである。
3. 書類送付先：「8 データの管理と解析」における、書類送付先を、電子媒体の場合は、大森、石川公平、吉村の 3 人とし、各種記録（GLP 準拠関連資料も含む）のコピーの場合は大森にした。コピー送付は手間のかかる作業なので、1 カ所にした方が良く、その場合の宛先としては、データ解析の担当者の大森が最も適当だからである。

光毒性試験代替法補完実験計画書

2006年7月4日 作成者 吉村 功

2006年7月14日 改訂責任者 吉村 功

0. まえおき

本研究は、日本動物実験代替法学会（本学会）バリデーション委員会が、実行委員会を組織して行うものである。研究遂行中に計画を変更したときは、その度ごとに改訂日、改訂内容、改訂責任者を記録する。

1. 研究目的

2003年から2004年にかけて行われた酵母光生育阻害試験（酵母試験）と赤血球光溶血性試験（溶血試験）の組み合わせ（試験バッテリー）の多施設バリデーション研究（前実験）において、酵母試験の SOP の不備が指摘された。試験バッテリーの提案者は、2006年5月に SOP の改訂を行った。その改訂の妥当性を検証するための実験（補完実験）を行い、改訂後の試験バッテリーの適用における施設間差を評価することが本研究の目的である。

2. 実行組織

補完実験を行う組織の正式名称を「酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会」として、略称を「補完実験実行委」とする。

メンバーは次の11人で、その連絡先は添付資料1の通りである。

1) 実験参加施設代表：

板垣宏（資生堂）、岡本裕子（コーセー）、長谷川靖司（メナード）、田中憲穂（食薬センター）、土肥孝彰（マルホ）

2) バリデーション委員会委員

大森崇（京都大）、吉村功（理科大、本実行委の委員長）

3) 技術担当：

穂谷昌利、石川牧恵（資生堂）、小島肇（国立衛研）、石川公平（理科大）

3. 研究日程

2006年7月4日に、第1回補完実験実行委員会を開催し、参加施設、実行委員、実験担当者、実行委員長を確定し、改定 SOP と補完実験計画書を確認した。

7月14日までに、試料と校正した強度計を各施設に配送する。

9月16日までに各施設が実験を行う。実験担当者は実験終了後可及的速やかに、データを大森、石川公平、吉村に送付し、GLP 準拠の関連資料のコピーを大森に送付する。

10月中旬に中間報告会を開催する。

12月末までに報告書をまとめる

4. 実験参加施設

実験参加施設は次の5施設である。

(株)コーセー研究本部品質保証センター（実験担当者：今井教安）

(株)資生堂品質保証センター（実験担当者：石川牧恵）

（財）食品薬品安全センター秦野研究所（実験担当者：若栗忍）

日本メナード化粧品（株）総合研究所（実験担当者：松永康明）

マルホ（株）京都R&Dセンター（実験担当者：米澤理一郎）

5. 被験物質

各施設で実験する被験物質は前実験と同じであるが、薬物コードは異なったものとする。配布は小島（国立衛研）が行う。実験担当者は被験物質の使用、保管、廃棄すべての段階において、それらを劇物として取り扱い、必要な記録を保管しなければならない。

6. 機器、消耗品と被験物質試料の準備

光源は、Dr. Hönle社のSOL500とする。強度計は小島が校正する。

資生堂（神奈川）自社の光源

食薬研（神奈川）自社の光源

マルホ（京都）自社の光源

コーセー（東京）研究班の光源1

メナード（名古屋）研究班の光源2

マイクロプレート、ペーパーディスク、酵母の手配は、共通消耗品は小島が配布する。

測定機器、実験条件で必要と思われることは各実験施設で記録を保管し、解析の際に問い合わせがあったら報告する。

7. 経費

本学会バリデーション委員会委員以外の旅費は実験参加施設等の自弁とする。

補完実験実行委が送付するもの以外の実験上の消耗品は各施設で自弁とする。

8. データの管理と解析

実験を行ったらできるだけ早く、結果を指定データシートに記入して、電子ファイルをメールで大森、石川公平、吉村に送付する。各種記録用紙（GLP準拠関連資料も含む）のコピーは「〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町 京都大学大学院医学研究科医療統計 大森崇助教授」に送付する。

報告されたデータは石川公平が点検し、疑問点を施設に確認し、必要な修正を行ったところでデータベースに固定する。

9. 検討会

一応のデータ解析ができた段階で、実行委員と実験担当者全員の参加の下で、固定されたデータの確認と解析結果の検討を行うための会合を開く。

10. 結果の公表

2006年12月末までに結果を厚生労働科学研究班の報告にする。

全体の結果は、厚生科学研究班報告書、学会報告、学術論文として公表する。公表の際の著者名については、検討会で確定する。

11. 各種問い合わせ先

実験内容についての疑問は、石川牧恵に問い合わせること。

被験物質、試料、共通消耗品についての疑問は、小島に問い合わせること。

データシートについての疑問は、石川公平に問い合わせること。

報告書、データの送付、研究の遂行についての疑問は、吉村に問い合わせること。

以上

改訂内容（敬称略）

2006年7月14日の改訂

ワープロミス・文章ミスの修正以外の、本質的な改訂部分と改訂理由は次の通りである。

1. 所属・氏名等：石川牧恵，小島肇等から，誤りの修正要求があったので改訂した。
（添付資料の名簿部分にも改訂が及んでいる。）
2. 本実行委の委員長：2-2)において，「委員長」と書かれていたところを「本実行委の委員長」とした。委員長が誰であるか明記しておいた方がよい，という注意を受けたためである。
3. 書類送付先：「8 データの管理と解析」における，書類送付先を，電子媒体の場合は，大森，石川公平，吉村の3人とし，各種記録（GLP 準拠関連資料も含む）のコピーの場合は大森にした。コピー送付は手間のかかる作業なので，1カ所にした方が良く，その場合の宛先としては，データ解析の担当者の大森が最も適当だからである。

皮膚感作性試験代替法（LLNA-DA 法）バリデーション研究計画書 ver.1.5

2006 年 2 月 1 日 作成者 吉村 功

2006 年 2 月 19 日 改定責任者 大森 崇

0. まえおき

本研究は、日本動物実験代替法学会（本学会）バリデーション委員会が実行委員会を組織して行うものである。

研究遂行中に本計画書の内容を変更したときは、その度ごとに改訂日、改訂内容、改訂責任者を本計画書に追記する。

1. 研究目的

本研究の目的は、皮膚感作性試験代替法の LLNA-DA 法 で得られる皮膚感作性の判定が、被験物質遮蔽下で、複数の施設間でどの程度一致するか（施設間再現性）、過去に LLNA 法で得られた判定結果とどの程度一致するか（代替可能性）、という 2 つの課題への解答を、多施設での実験を通して評価することである。

2. 実行組織

本組織の正式名称を「LLNA-DA 法バリデーション研究実行委員会」とし、連絡等での略称は「LLNA-DA バリ実行委」とし、本計画書内では単に「本実行委」とする。

本実行委は次の委員で構成する。

- 1) 実験参加施設代表：実験参加施設から各 1 名
- 2) バリデーション委員会委員：若干名
- 3) 技術担当として必要な委員：若干名

実際の委員は、それぞれの組織からの推薦に基づいて本学会バリデーション委員会が任命し、資料 1「LLNA-DA バリ実行委リスト」にリストアップしておく。決定の理由及び時点は記録に残す。

研究遂行においては、大野泰雄が主任研究者を務める厚生労働科学研究「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」班の協力を得る。

本実行委では以下の役割の担当者を本実行委の内あるいは外から委嘱し、その氏名を資料 2「LLNA-DA バリ研究担当者リスト」に残す。

実行委員長：研究組織と運営・進行を計画通りに行い、最終報告を作成する。

技術研修担当者：技術研修の準備を行い、試験法の内容、SOP、記録用紙等の説明を行い、実技指導を行う。

被験物質選定担当者：資料 3「被験物質候補リスト」より、研究に用いる物質を選定する。

被験物質割付担当者：選定された被験物質を各施設に割り付けるための割付デザインを作成して試料等手配担当者に知らせ、研究結果が確定・公表されるまで割付の根拠を

保管する。

動物・測定機器手配担当者：実験用動物の注文・配布，測定機器の貸借の手配を行う。

試料等手配担当者：割付デザインと SOP に従って試料を調製し，コード化して実験参加施設に，関連する試材と共に送付する。研究結果が確定・公表されるまで，割付表とコード表を保管する。

実験担当者：技術研修を受け，試料・機器手配担当者から送付された試料等を用いて，SOP に従った実験を行い，実験結果をデータ解析担当者に送付する。

データ解析担当者：必要なデータクリーニングを行い，データベースを固定し，データ解析を行う。中間報告会では，解析結果をまとめて報告する。

3. LLNA-DA 法の実験手順

実験担当者は，資料 4「LLNA-DA 法プロトコール」にもとづいて本実行委が作成した資料 5「LLNA-DA 法実験 SOP (Version 1.5)」に従って，本実行委が用意あるいは指定した試料・機材を用いて，LLNA-DA 法による被験物質の評価実験を行う。

4. 研究日程

本学会バリデーション委員会は 2006 年 2 月 6 日に，実験参加施設を確定し，委員と研究計画書を決定し，委員会を発足させ，以後の研究遂行を本実行委に委任する。

本実行委は 2006 年 2 月末までに技術研修を実施する。

実験担当者は，2006 年 3 月 24 日までに各施設で予備実験を行い，本研究計画書及び，LLNA-DA 法実験 SOP の改訂についての意見を提出する。本実行委はこれらの意見に基づいて，本研究計画書と LLNA-DA 法実験 SOP の改訂を行い，第 1 次バリデーション実験（1 次実験）の実験施設を確定する。

1 次実験の実験担当者は 2006 年 4 月より実験を開始し，2006 年 7 月末までに実験結果をデータ解析担当者に報告する。

本実行委は 2006 年 8 月に 1 次実験の中間報告会を開催する。

本実行委は 2006 年 9 月末までに 1 次実験の報告書をまとめ，第 2 次バリデーション実験遂行についての検討を行う。この検討では，必要に応じて研究計画の見直しと SOP の改定も行う。

本実行委は 2006 年 12 月に LLNA-DA 法のバリデーション研究の報告書を本学会バリデーション委員会に提出する。

5. 実験参加施設

実験参加施設は，次の条件を満たすものとする。

- (1) 本実行委に本学会会員を施設代表として参加させる。
- (2) 実験において施設に求められる機材等（動物飼育施設等）を用意できる。
- (3) 実験担当者に技術研修を受けさせる。

6. 被験物質

被験物質選定担当者は資料3「被験物質候補のリスト」から、既知データに基づいて、皮膚感作性が弱度、中度、強度、極度のものが含まれるように、被験物質を選定し、選定結果を被験物質割付担当者に知らせる。被験物質としては、なるべく既知データが豊富で、LLNAの試験結果が存在するものを採用する。被験物質割付担当者は割付のデザインを作成し、試料等手配担当者に知らせる。試料等手配担当者は被験物質割付担当者のデザインに基づいて、実験担当者に被験物質が何であるかわからないようにコード化して、関連試料と共に実験参加施設に送付する。

7. 被験物質の実験参加施設への割付

本実行委は、表1に概念的に示すように、被験候補物質の内の3物質を標準被験物質とし、全参加施設に割り付ける。その他の被験物質は、被験物質割付担当者が実験参加施設の規模・能力に応じて割り付ける。被験物質コードと実験参加施設への割付、被験物質溶液の調製・配布は、試料・機器手配担当者が行ってその記録を管理する。

表1 被験物質の割付方針の概念図

	参加施設 A	参加施設 B	参加施設 C	...
標準被験物質 1	○	○	○	○
標準被験物質 2	○	○	○	○
標準被験物質 3	○	○	○	○
被験物質 4	○			
被験物質 5	○	○		
被験物質 6	○	○	○	
被験物質 7		○	○	○
被験物質 8			○	○
...				...

8. 実験動物、機器、被験物質試料の準備

試料等手配担当者は、皮膚感作性の強度に応じて各被験物質の試料溶液を調製し、実験参加施設に配布する。

動物・機器手配担当者は、各実験施設と打ち合わせを行い、動物と測定機器の手配を行う。

9. 経費

本実行委に参加するための旅費は自弁とする。

本実行委が送付するもの以外の、実験器具・消耗品の費用は、各実験参加施設が負担する。ただし、実験用動物購入の費用は半額を本実行委が負担する。

10. 技術研修と予備実験

本実行委は2006年2月20日にダイセル化学工業株式会社(姫路), 2月23日に国立医薬品食品衛生研究所(用賀)で技術研修を実施する。実験担当者は, この技術研修の少なくとも一つを受けなければならない。

技術研修を終わった実験担当者は, 自施設で溶媒及び陽性対照物質について予備実験を行い, 結果をデータ解析担当者に送付する。

データ解析担当者は, 送付されたデータを速やかに検討し, 3月27日の第2回実行委員会で検討結果を本実行委に報告する。実行委員長は, データ解析担当者からの報告を検討し, 本実験に進むことについての結論を出し, 実験参加施設に通知する。実行委員長は, 計画変更の必要があると判断したとき, 直ちに, 対面あるいはメールでの実行委員会を招集し, 計画変更を審議し, 滞りない進行を図るものとする。

11. データ管理

実験担当者は, 以下の記録・結果を所定の記録用紙に記録する。

- (1) 被験物質, 溶媒, 陽性対照物質溶液, SLS水溶液の調製記録
- (2) 被験物質使用記録
- (3) 動物の入荷, 管理, 群分けに関する記録
- (4) 投与記録および観察記録
- (5) 使用試薬, キットに関する記録
- (6) 体重測定結果
- (7) リンパ節重量測定結果
- (8) ATP発光量測定結果

実験担当者または実験参加施設代表者は, 記録用紙の情報を所定の電子ファイルに転載し, 電子ファイル, および記録用紙のコピーをデータ解析担当者に送付する。記入要領は技術研修会で担当者が説明する。

12. データ解析

データ解析担当者はデータ内容についての疑問を各実験者に問い合わせ, クリーニングを行った後に, 基本データベースを作成する。データベースには, 前節で求められている記録のうち, 実験結果の理解に必要なことを全て含める。

データ解析担当者は, 研究の目的に沿ったデータ解析を行う。解析では, 次の2つを主解析とする。

- (1) 標準被験物質のSI値及び指定したSI値を与える用量の施設間ばらつきの評価
- (2) 過去の生体での実験結果との比較における, 感度・特異度・一致度の評価

データ解析担当者は, データ解析の結果を中間報告会及び最終報告会で報告する。

本実行委の委員長は, 各施設から送られてきたGLP準拠の記録のコピー, データベース, データ解析結果等を, バリデーション研究の成果が社会的に承認されたと, 本学

会バリデーション委員会が判断するまで指定した場所（国立医薬品食品衛生研究所，安全性生物試験研究センター，薬理部，新規試験法評価室）に5年間保管する。

13. 中間報告会

データベースが固定され，一通りのデータ解析ができた段階で，実行委員長は，固定されたデータの確認と解析結果の検討を行うために，本実行委の委員と実験担当者が参加する中間報告会を開催する。

14. 結果の公表

実行委員長は，中間報告会の討論結果をふまえた報告書を作成し，最終報告会を開催した後，最終報告書を本学会バリデーション委員会に提出する。

本実行委は，研究結果を厚生労働科学研究班報告書，学会報告，学術論文として公表する。公表の際の著者名は本実行委の委員とし，実験担当者名を報告書末尾に記載する。

15. 各種問い合わせ先

実験内容と SOP：出原賢治「メールアドレス：kn_idehara@daicel.co.jp」

被験物質，試料，共通消耗品：小島肇夫「h-kojima@nihs.go.jp」

データシートとその送付：寒水孝司「sozu@ms.kagu.tus.ac.jp」

計画書，報告書，その他一般事項：大森崇「omori@pbh.med.kyoto-u.ac.jp」

以上

2006年2月19日の改定内容

1. 「1. 研究目的」に被験物質遮蔽下で行う旨を追記した。
2. 「3. LLNA-DA 法の実験手順」に該当する Version (Version 1.5) を記載した。
3. 「7. 被験物質の実験参加施設のへの割付」に，標準物質が2から3に変更されたことを反映させた。
4. 「12. データ解析」に資料の保管場所と保管期限を追記した。
5. 「デザインレビュー原案シート」(18A1) の対処原案に従い，期日の明確化や用語の修正を行った。

以上5点 文責 大森崇

LLNA-DA 法標準作業手順 Version 1.5

2006年2月6日 LLNA-DA バリ実行委で確認

2006年2月17日 改訂責任者 大森 崇

2006年2月19日 改訂責任者 大森 崇

以下に、LLNA-DA 法バリデーション研究における実験の標準作業手順を示す。手順は被験物質が 2 物質の場合を想定して記述してある。

0 機器・器具の準備

表 1 に示す実験機器・器具を用意する。ルミノメーター用チューブ、15mL 容チューブ、50mL 容チューブ、シャーレ、スライドガラスは使い捨てとする。

1 動物入荷前準備

動物としては、LLNA-DA バリ実行委が手配した、出産および妊娠経歴のない CBA/JNCrj マウスの雌で、投与（SLS 水溶液、試験液の塗布）開始時に 8~12 週齢のものを使用する。入荷予定日を事前に協議・決定し、入荷前に、4 匹を飼育できるケージを 9 個用意し、それぞれのケージに以下のような内容を表記しておく。ここで被験物質の「A」あるいは「B」という記号は配布された試料の記号である。データの記入ミスを防ぐために、特に理由がなければ、群番号はこの順にする。実験を複数回に分けて行う場合は、実験番号も表記しておく。

群番号	表記
第 1 群	「AOO」
第 2 群	「陽性対照」
第 3 群	「溶媒」
第 4 群	「被験物質 A 低用量」
第 5 群	「被験物質 A 中用量」
第 6 群	「被験物質 A 高用量」
第 7 群	「被験物質 B 低用量」
第 8 群	「被験物質 B 中用量」
第 9 群	「被験物質 B 高用量」

2 入荷、群分け、馴化

マウスが入荷したら、4 匹ずつ各ケージに入れる。37 匹入荷されるため、第 1 群のみ 5 匹で飼育する。室温 22°C (±3°C)、湿度 30~70%、12 時間明暗サイクルの条件下で 5 日以

上 16 日以内の馴化飼育を行う。馴化飼育の間、餌および水は自由に摂取させる。

馴化の後、耳介の損傷等の異常が認められない動物を試験に供し、乱数等を用いてランダムに 4 匹ずつ 9 群に群分けする。36 匹を超える動物は処分する。

異常が認められない動物が 36 匹に満たない場合は、群番号の大きい順に 1 群 3 匹で試験を実施する。

3 試料の確認

LLNA-DA バリ実行委から試料がとどいたら、送付されている内容表と内容物が一致していることを確認する。

試料の内の、試験液 (AOO、陽性対照、溶媒、被験物質 A 低用量、被験物質 A 中用量、被験物質 A 高用量、被験物質 B 低用量、被験物質 B 中用量、被験物質 B 高用量) にそれぞれ対応する群番号 1~9 を記入し、試験管立て等に順に並べる。SLS 水溶液は群の数だけあるので、これにも群番号をつけ、試験管立て等に順に並べる。並べた試料は約 4℃ で速やかに冷蔵保管し、試験の際はこれを取り出して使用する。

AOO は Acetone/olive oil (4:1 v/v)

陽性対照は Hexyl cinnamic aldehyde (HCA、CAS No: 101-86-0) の溶液

SLS は Sodium lauryl sulfate (CAS No:151-21-3)

SLS 水溶液の濃度は 1% である。

4 実験開始 1 日目、2 日目、3 日目、7 日目の操作

4-1 1 日目の操作

各群の動物の尾部に、群番号と 1~4 のマーキングを施し、体重を測定して所定の用紙に記録する (最小単位: 0.1g)。

試料を冷蔵より取り出す。試料に添付されている指示書に試験液の投与前の加温あるいは超音波処理が指示されている場合は、指示にしたがって前処理を行う。

第 1 群から順に第 9 群まで、マウスの両耳介背面に、筆を用いて、対応する群番号の SLS 水溶液を塗布する。塗布においては、筆を SLS 水溶液に浸し、マウスの一方の耳介背面を 4~5 回撫でるようにして、全体に塗布する。筆を再度 SLS 水溶液に浸し、他方の耳介背面にも同じ要領で SLS 水溶液を塗布する。

第 1 群の SLS 水溶液塗布の開始時刻および第 9 群の SLS 水溶液塗布の終了時刻を記録する。塗布操作は第 1 群から第 9 群まで連続して速やかに実施する。

筆は 9 本に予め群番号を付与しておき、群専用で使用する。2 日目以降、マウス耳介に残留した試験液により筆が汚染される可能性があるため、一群の SLS 水溶液塗布が終わったら、次の群の塗布を行う前に群番号を確認の上、交換する。使用後は流水で十分に洗浄し、翌日の使用に備える。

SLS 水溶液塗布の開始時刻の 1 時間後に、第 1 群から順に第 9 群まで、マウスの

耳介に、対応する群番号の試験液の塗布を開始する。塗布においては、マイクロピペッター等で試験液を 25 μ L 採取し、マウスの一方の耳介背面に徐々に滴下し全体に塗布する。再度試験液を 25 μ L 採取し、他方の耳介背面に同じ要領で試験液を塗布する。

試験液塗布の際、マイクロピペッター等のチップは群ごとに交換する。試験液で汚染される可能性があるため、一群の塗布終了の度に、マイクロピペッター等の先端にアルコールスプレーを噴霧後拭き取る等の操作により汚れを除去する。

第 1 群の試験液塗布の開始時刻および第 9 群の試験液塗布の終了時刻を記録する。塗布操作は第 1 群から第 9 群まで連続して速やかに実施する。

エーテル麻酔を行うと SLS 水溶液及び試験液の塗布が容易になるが、麻酔を行うことは必須でない。

試験液塗布終了後、試料は速やかに冷蔵する（約 4℃）。

4-2 2 日目、3 日目の操作

1 日目と同じやり方で SLS 水溶液と試験液の塗布を行う。

操作中に動物を注意深く観察し、耳介の損傷・硬化・肥大・発赤、立毛・運動低下などの異常所見が認められた場合は、その所見を所定用紙に記録する。

4-3 7 日目の操作

7 日目に、2、3 日目と同じ操作を行う。

リンパ節摘出の操作を、7 日目の塗布開始時刻の 24 時間後と 30 時間後の間に実施するので、7 日目の操作は午前中もしくは午後の早い時間帯に実施することが望ましい。

5 8 日目の操作：リンパ節の摘出と ATP 量の測定

5-1 実験前準備

PBS を、1.98mL ずつ、15mL チューブ 72 本に分注しておく。分注は無菌操作で行う。

PBS を 50mL チューブに、36mL 以上採取しておく。採取は無菌操作で行う。

ATP 測定キットの説明書に従い、発光試薬を溶解しておく（7.2mL 以上必要）。配布される ATP 測定キット「ルシフェール 250 プラス」には発光試薬、発光試薬溶解液、ATP 抽出試薬がそれぞれ 5 本ずつ含まれており、このうち 2 本ずつを使用する。説明書に従い発光試薬 2 本を溶解した後、15mL チューブ 1 本に混合する（約 11mL）。アルミホイル等で遮光し、使用するまで冷蔵（2~8℃）保管する。ただし、使用直前に室温に戻し、使用時はアルミホイル等を外す。

ATP 測定キットの ATP 抽出試薬を 0.1mL ずつルミノメーター用チューブ 72 本に分注しておく。