

ATP 測定キットの試薬は、ATP や微生物の混入を避けるため、滅菌済みのチップ等を用いて無菌的に取り扱う。

## 5-2 体重測定

マウスの体重測定を実施し、所定用紙に記録する（最小単位：0.1g）。

## 5-3 リンパ節摘出、リンパ節重量測定

5-3、5-4、5-5 の操作を、7 日目の試験液塗布開始時刻の 24 時間後から 30 時間後の間に実施する。5-3、5-4、5-5 の操作に必要な器具を補遺 1 に示した。

マウスをエーテル麻酔で安楽死させ、直ちに、図 1 に示す左右両耳下リンパ節（Auricular lymph node、1 個の場合と 2 個の場合がある）をすべて摘出する。摘出したリンパ節は、1 個体分をシャーレに入れ、直ちに電子天秤で湿重量を測定する（最小単位：0.1mg）。

## 5-4 細胞懸濁液の調製

1 個体分のリンパ節を 2 枚のスライドグラスにはさみ、軽く力を加えて押しつぶす（図 2）。組織が薄く広がったのを確認した後、スライドグラスを引き離す。

両スライドグラス上の組織を 1mL の PBS に懸濁させる。懸濁においては、図 3 に示すように、シャーレで受けながら、1 枚ごとのスライドグラスに PBS を掛け流し、セルスクレーパーでスライドグラス上の組織を掻き取ることを数回繰り返す。2 枚のスライドグラスに対して使用する PBS は 1mL とする。

シャーレ内の組織懸濁液をセルスクレーパーで軽く攪拌し、肉眼で確認できる膜組織を入れないように注意して、マイクロピペッターで 20 $\mu$ L の懸濁液を採取する。これを PBS 1.98mL に添加し、よく攪拌して第 1 系統液を調製する。再度 20 $\mu$ L の懸濁液を採取し、PBS 1.98mL に添加し、よく攪拌して第 2 系統液を調製する。

操作は手袋・マスクを着用して行い、マイクロピペッター等のチップは滅菌済みのものを用いる。

操作の手順の詳細を補遺 2 に示した。

## 5-5 ATP 量の測定

予め、ルミノメーター用チューブ 72 本に、送付された ATP 抽出試薬を 0.1mL ずつ分注しておく。よく攪拌した各系統液を 0.1mL 採取してルミノメーター用チューブに添加し、よく攪拌する。約 20 秒間静置した後、これに溶解した発光試薬 0.1mL を添加し、すばやく攪拌してルミノメーターにかけ、表示される（10 秒間の）発光量（RLU：Relative Light Unit）を読み取り、所定用紙に記録する。

発光量は、発光試薬の添加後に速やかに減少するので、発光試薬添加からルミノメ

ーターの測定ボタンを押すまでの操作は、出来るだけ素早く、かつ一定のリズムで行わなければならない。

操作は手袋・マスクを着用して行い、マイクロピペッター等のチップは滅菌済みのものを用いる。

操作の手順の詳細を補遺3に示した。

## 6 摘出から ATP 測定までの操作に関する注意事項

リンパ節の ATP 含有量は、動物死亡後、経時的に減少する。従って、動物の安楽死から ATP 測定までの所要時間は、どの個体でも同じであることが望ましい。摘出から ATP 測定までの一連の操作は、途中で滞留することなく、速やかに実施しなければならない。

## 7 データの入力

1 日目および 8 日目の体重測定値、リンパ節重量測定値、ATP 発光量を所定のエクセルファイルに記入する。

## 8 参考文献

ICCVAM Immunotoxicology Working Group, ICCVAM Peer Review Panel Evaluating the LLNA. *ICCVAM IWG LLNA Protocol* (2001) Protocol: Murine Local Lymph Node Assay (LLNA).

表1 実験機器、実験器具リスト

LLNA-DAIには以下の機器・器具またはその同等品を使用する。

機器・器具名	メーカー	商品名または品番	規格、その他
ルミノメーター	キッコマン株式会社	LUMITESTER C-100	測定範囲: $4 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-6}$ M ATP 上限: 1000000RLU
ルミノメーター用チューブ	キッコマン株式会社	ルミチューブ	3.5ml, 55 × 12mm φ、ポリプロピレン製、 EOG滅菌済み
15ml容チューブ	IWAKI	遠沈管	ポリプロピレン製、Non-pyrogenic、Sterile
50ml容チューブ	IWAKI	遠沈管	ポリプロピレン製、Non-pyrogenic、Sterile
シャーレ	Corning Inc.	Cell Culture Dish	35mm × 10mm、Non-pyrogenic、Sterile
セルスクレーパー	Costar Corporation	Disposable cell scraper	Sterile
スライドグラス	MATSUNAMI GLASS IND., LTD.	MICRO SLIDE GLASS	76 × 26mm、Thickness 0.9~1.2mm
ボルテックスミキサー	Scientific industries, Inc.	VORTEX-GENIE 2™	
電子天秤(試薬調製用)	METTLER	AJ 180	最小 0.1mg
電子天秤(リンパ節重量測定用)	METTLER	AE 240	最小 0.01mg
筆	一休園	和尚	細筆B、漢字用一般細字用

表2 試薬、溶剤リスト

試薬・溶剤名	備考
SLS Sodium lauryl sulfate	CAS RN: 151-21-3
Acetone Acetone	CAS RN: 67-64-1
Olive oil Olive oil	
DMSO Dimethylsulfoxide, dehydrated	CAS RN: 67-68-5
DMF Dimethylformamide	CAS RN: 68-12-2
PBS Phosphate Buffered Saline, 7.2	Invitrogen Gibco™ 0.1 μm filterd
発光試薬 ルシフェール 250 プラス	KIKKOMAN社 ATP測定用試薬キット 商品コード: 60312
滅菌蒸留水 Distilled Water	

Figure 1: Lateral Dissection

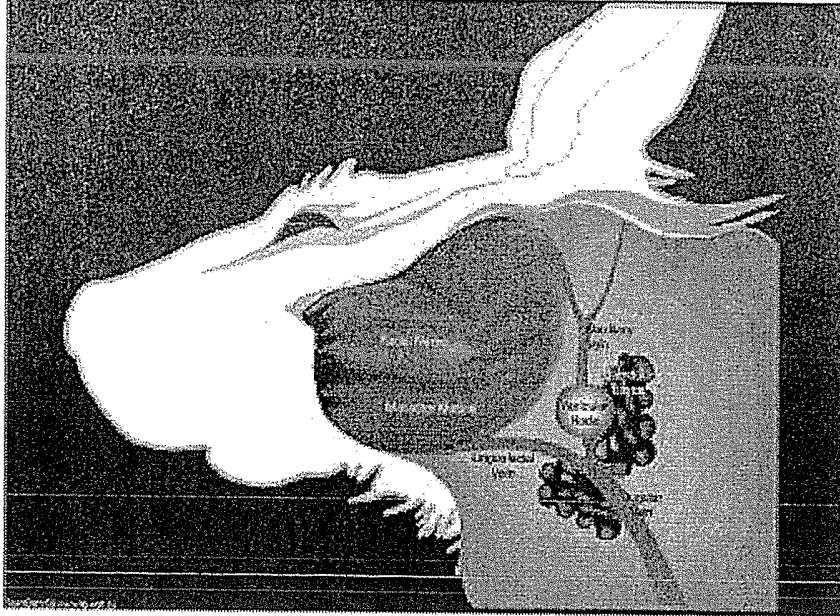


Figure 2: Ventral Dissection

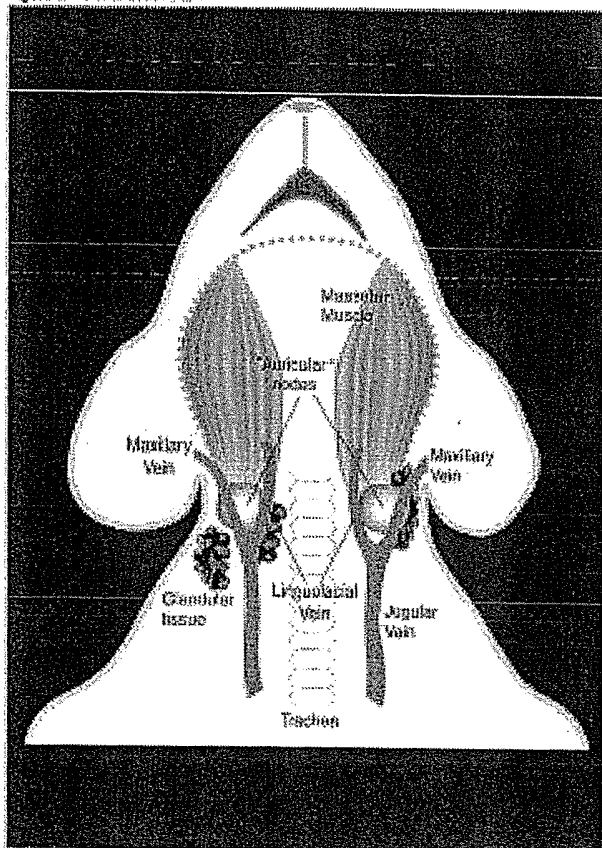


図1 耳下リンパ節 (Auricular lymph node)

ICCVAM IWG LLNA Protocol より引用。

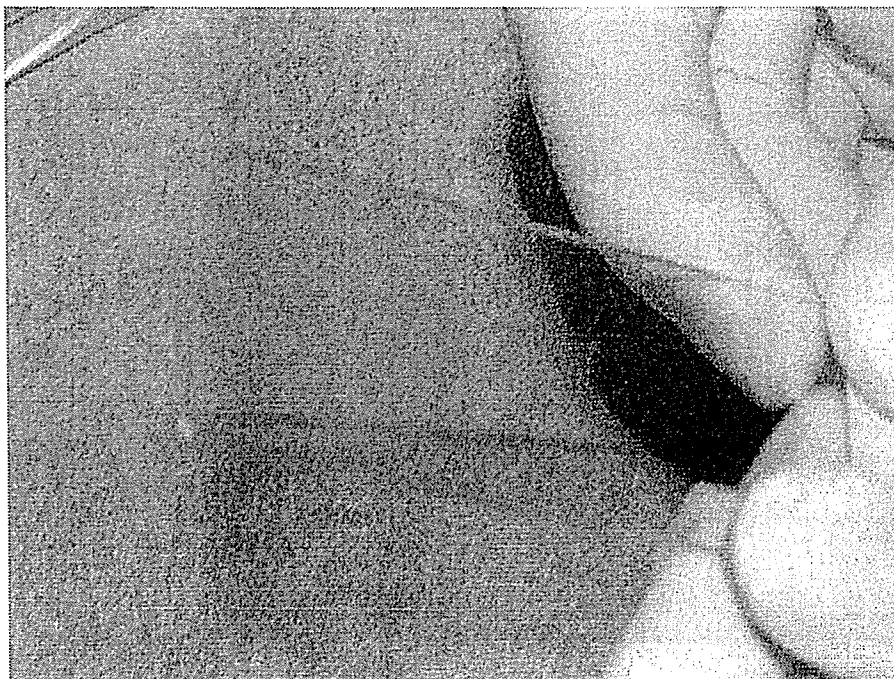


図 2 細胞懸濁液の調製(1)

摘出したリンパ節を個体ごとに二枚のライドグラスにはさみ押しつぶす。

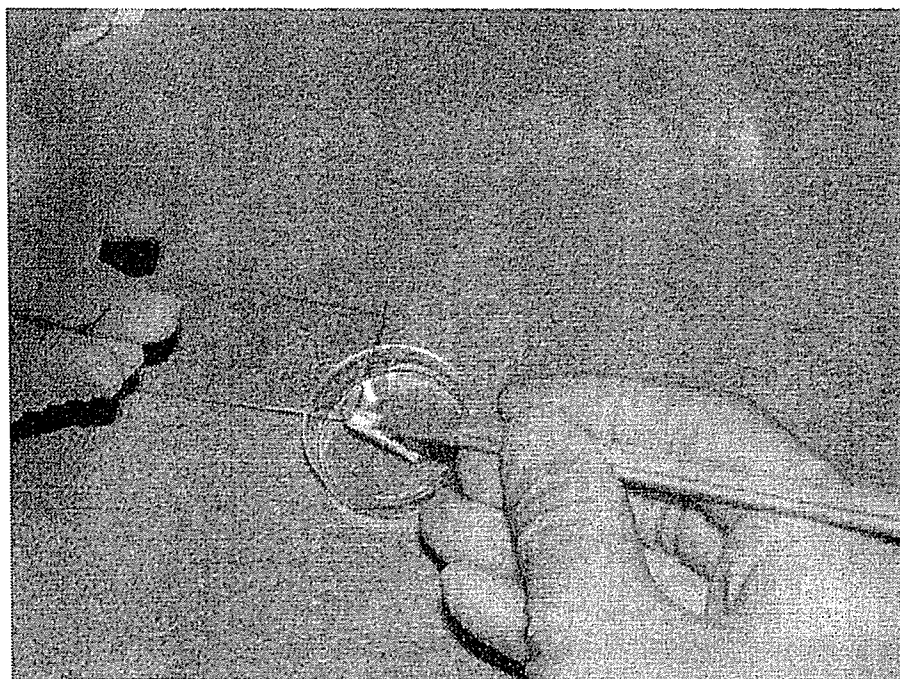


図 3 細胞懸濁液の調製(2)

PBS を掛け流し、セルスクレーパーでライドグラス上の組織を掻き取る。シャーレの液をすくいながら数回繰り返す。PBS 量は個体ごとに 1ml とする。

## 《リンパ節摘出、ATP 測定操作フロー》

### 1) 前準備

PBS を 1.98ml ずつ 15ml 容チューブに分注しておく (評価する動物数×2)。別に PBS を 50ml 容チューブに取り分けておく (評価する動物数×1ml 必要)。

「ATP 抽出試薬」を 0.1ml ずつルミノメーター用チューブに分注しておく (評価する動物数×2)。

「発光試薬」を溶解しておく。(評価する動物数×0.2ml 必要)  
ルミノメータの電源を入れ安定化しておく。

### 2) エーテル麻酔による安楽死

1 匹のみ安楽死させるかまたは 1 投与群の 4 匹同時でも良い。ただし、摘出したリンパ節は ATP 測定まで滞留させることなく速やかに処置する。

### 3) 両耳下リンパ節摘出

両耳下リンパ節を摘出、1 個体分をシャーレ採取する。

### 4) リンパ節重量測定

電子天秤で個体ごとに湿重量を測定する。

### 5) 細胞懸濁液調製

リンパ節を二枚のスライドグラスで押しつぶし、1ml の PBS に懸濁させる。

その 20 $\mu$ L 採取し、PBS1.98mL に懸濁させ、よく攪拌する。

PBS1.98ml は個体ごとに 2 本を使用し、2 系統の細胞懸濁液を調製する。

### 6) ATP 測定

2 系統の細胞懸濁液の ATP 量を順に測定する。

細胞懸濁液 0.1ml を「ATP 抽出試薬」が分注されたルミノメーター用チューブに添加し、20 秒静置後、「発光試薬」0.1ml を添加し直ちに発光量を測定する。

## 図 4 操作フロー

単独で行う場合の安楽死は、1 匹ずつ行う。複数の作業員で分担して行う場合は群ごとに安楽死させてもよい。2 人の作業員で行う場合は 2)、3)、4) を一人が受け持ち、5)、6) をもう一人が受け持つ。このばあい、作業が滞留する事がないよう、摘出のタイミングを合わせる事が重要である。

補遺1 5-3、5-4、5-5の操作で使用する実験器具および試薬

下線の器具または試薬はLLNA-DAバリ実行委が手配したものをを用いる。

ただし、ルミテスターを自施設で調達する場合は、ルミチューブも自施設で調達する。

5-3 リンパ節摘出、リンパ節重量測定

手術道具一式（技巧ピンセット、眼科バサミ、手術台、注射針など固定具等）

消毒液

脱脂綿

シャーレ 36個

電子天秤（最小単位0.1mg以下）

5-4 細胞懸濁液の調製

PBS 1.98mL入り 15mLチューブ 72本

PBS 36mL以上入り 50mLチューブ 1本

スライドグラス 72枚

技巧ピンセット 1本

マイクロピペッター 1000 $\mu$ L用 1本（計測量は1mL）

マイクロピペッター 100 $\mu$ L用 1本（計測量は20 $\mu$ L）

セルスクレーパー 1本

滅菌済みピペッターチップ 1000 $\mu$ L用 36本、100 $\mu$ L用 36本

ボルテックスミキサー 1台

ペーパータオル等

撥水シート等清浄なシート（ディスポシート等）

試験管立て

5-5 ATP量の測定

ATP抽出試薬 0.1mL入りルミチューブ 72本

溶解した発光試薬入り 15mLチューブ 1本

マイクロピペッター 100 $\mu$ L用または200 $\mu$ L用 2本（計測量は0.1mL）

滅菌済みピペッターチップ 144本

タイマー（秒表示のもの） 1個

ルミテスター 1台

ボルテックスミキサー（5-4細胞懸濁液の調製と共通で可）

試験管立て

ルミチューブ立て（エッペンチューブ用など）

## 補遺 2 5-4 細胞懸濁液の調製の実験手順

- ① 実験台上に撥水シート等を敷き、スライドグラス 1 枚を置く。
- ② 重量測定済みのリンパ節 1 個体分を、技巧ピンセットを用いて、シャーレからスライドグラスの中央上側に移す。
- ③ 別のスライドグラスを上から重ねる。
- ④ 重ねたまま持ち上げ、スライドグラス中央上側を指で挟んでリンパ節をつぶす。  
(軽い力で充分、強すぎると細胞が壊れる)。
- ⑤ 2 枚のスライドグラスの間に組織が薄く広がったのを確認し、重ねたままスライドグラスを撥水シート上に置く。
- ⑥ 1000  $\mu$ L 用マイクロピペッターにチップを装着し、50mL チューブから PBS 1 mL を採取する。
- ⑦ 重ねたスライドグラスをはがし、内 1 枚を細胞付着面を上にして滅菌紙上に置き、もう 1 枚を細胞付着面を手前にしてシャーレ中に立て、PBS 1 mL を掛け流す。
- ⑧ 1000  $\mu$ L 用マイクロピペッターのチップを廃棄する。
- ⑨ セルスクレーパーを持ち、シャーレ中の PBS をすくうようにしながらスライドグラス上の組織を掻き取ることを数回繰り返す。スライドグラス上に組織が残っていないもしくはわずかであることを確認し、廃棄する。
- ⑩ ⑦ で置いたスライドグラスを取り、同様に組織を掻き取り、廃棄する。  
スライドグラス上の組織が乾燥すると掻き取りにくくなるので、④ から⑩ の操作は迅速に行う。
- ⑪ セルスクレーパーでシャーレ内の組織懸濁液を軽く攪拌する。
- ⑫ セルスクレーパーをペーパータオルでふき取る (次の個体にも使用する)。
- ⑬ 100  $\mu$ L 用マイクロピペッターにチップを装着し、シャーレを傾け、数度ピペッティングした後、肉眼で確認できる膜組織を入れないように注意して、20  $\mu$ L の懸濁液を採取する。
- ⑭ PBS 1.98mL 入り 15mL チューブを取り、20  $\mu$ L の懸濁液を添加、ピペッティングした後、ボルテックスで攪拌する (第 1 系統液)。
- ⑮ 同様に⑬、⑭ の操作により、第 2 系統液を調製する。
- ⑯ 100  $\mu$ L 用マイクロピペッターのチップを廃棄する。



補遺 3 5-5 ATP 量の測定

- ① 100 $\mu$ L 用（または 200 $\mu$ L 用）マイクロピペッターにチップを装着し、第 1 系統液をとり、ボルテックスで攪拌した後、0.1mL を採取する。
- ② ATP 抽出試薬 0.1mL 入りルミチューブを取り、タイマーで時刻を確認し、第 1 系統液 0.1mL を添加する。チップは廃棄する。
- ③ ボルテックスで攪拌し、ルミチューブ立てに静置する。
- ④ 別の 100 $\mu$ L 用（または 200 $\mu$ L 用）マイクロピペッターにチップを装着し、溶解した発光試薬 入り 15mL チューブから溶解液 0.1mL を採取する。
- ⑤ 静置したルミチューブを取り、②で確認した時刻の 20 秒後に、溶解液 0.1mL を添加する。
- ⑥ 素早くボルテックスで攪拌し、ルミノメーターにかけ、スイッチを押す。  
発光量は、発光試薬溶解液添加後に速やかに減少するので、⑥の操作は、出来るだけ素早く、かつ一定のリズムで行わなければならない。
- ⑦ チップを廃棄する。
- ⑧ 10 秒後に発光量（RLU : Relative Light Unit）が表示されるので、所定用紙に記録する。
- ⑨ ①から⑧の操作を同様に行い、第 2 系統液の発光量を測定、記録する。

## 2006年2月17日の改訂内容

本文章 (Version 1.4) では、改定前の文書 (Version 1.0) の訂正箇所には二重線を引き、追記箇所は赤字で示したものであるので、内容に関しては次回の改定時にあわせて記載することとする。

## 2006年2月19日の改訂内容

本文章 (Version 1.5) は、改定前の文書 (Version 1.4) の二重線を付した箇所を削除し、赤字で示した箇所を黒字に改めた。加えて Version 1.4 からさらに2点の変更を行った。

### Version 1.0 からの改訂内容

1. 「SOPVer. 1.0 へのコメント」(8)の用語の定義に従って、全文を修正した。
2. 「デザインレビュー原案シートの指摘事項への対処原案」(18A1) に従い、条件の明確化もしくは限定解除を行った。
3. 1頁 2 室温を「21℃ (±3℃)」から「22℃ (±3℃)」に変更した。
3. 1頁 2 群分けは馴化後行うことに変更した。
- 4・1頁 2 馴化期間を16日以内とした。
5. 1頁 2 異常が認められた動物への対処を追加した。
6. 2頁 3、4-1 試料を速やかに冷蔵することを追加した。
7. 2頁 4-1 群番号のマーキングも行うことを追加した。
8. 2頁 4-1 塗布操作は連続して速やかに実施することを追加した。
9. 2頁 4-1 アルコールスプレー噴霧・拭き取り操作は、これのみに限定しない記載とした。
10. 3頁 4-2 「発赤」を追加した。
11. 3頁 5-1 4頁 5-4、5-5 PBS、ATP 測定キットの取り扱いを無菌的に行う表現を追加した。
12. 3頁 5-1 発光試薬溶解の手技を追加した。
13. 3頁 5-1 発光試薬溶解液を使用前に室温に戻すことを追加した。
14. 4頁 5-3 に実験器具のリストを補遺1として挿入した。
15. 4頁 5-4、4頁 5-5 に操作手順の詳細として補遺2、3、をそれぞれ挿入した。
16. 4頁 5-4、5-5 操作時に手袋・マスクを着用することを追加。
17. 「デザインレビュー原案シートの指摘事項への対処原案」(18A1) に従い、誤字、脱字の修正、文の校正を行った。

### Version 1.4 からの改訂内容

1. 2頁 4-1 SLS 水溶液塗布に用いる筆は群専用とする旨を追記した。
2. 10頁 補遺1 5-5 「滅菌済みピペッターチップ」が重複しているので削除。

# LLNA-DA 法バリデーション研究報告書

Version 1.0

報告書作成日：2006年12月28日

報告書作成責任者：大森 崇

## LLNA-DA 法バリデーション研究実行委員

### 委員長

大森 崇（京都大学大学院医学研究科医療統計学分野）

### 委員

小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所薬理部）

寒水孝司（大阪大学臨床工学融合研究教育センター）

吉村 功（東京理科大学工学部経営工学科）

出原賢治（ダイセル化学工業株式会社 評価・解析センター）

五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部）

金澤由基子（財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 医療用具試験室）

武吉正博（財団法人 化学物質評価研究機構安全性 評価技術研究所  
研究第一部）

小坂忠司（財団法人 残留農薬研究所 毒性部）

浦谷 衛（石原産業株式会社 中央研究所 安全科学研究室 安全性グループ）

山中 淳（ピアス株式会社 中央研究所 ARI 評価グループ）

篠田伸介（株式会社 薬物安全性試験センター埼玉研究所 第二毒性部）

中村洋介（住友化学株式会社 情報電子化学業務室）

青儀 巧（大塚製薬株式会社 徳島研究所 安全性研究センター 第2研究室）

米田知史（トーアエイヨー株式会社 研究開発部 福島研究所）

花田智彦（日本新薬株式会社 創薬研究所 安全性研究部）

猪田健人（中野製薬株式会社 マーケティング本部研究）

田中正志（明治製菓株式会社 医薬開発部門 動態安全性研究所）

有馬和範（大正製薬株式会社 安全性研究所）

宇佐美雅仁（ホーユー株式会社 総合研究所 基礎研究室）

篠田直樹（参天製薬株式会社奈良研究開発センター）

湯浅敦子（富士フイルム株式会社 CSR 推進部 環境・品質マネジメント部  
素材試験センター）

牧 栄二（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）

略号の原語または意味

略号	原語	意味
ACD	Allergic Contact Dermatitis	
AOO	Acetone/Olive Oil	
ATP	Adenosine triphosphate	
BT	Buehler Test	
EC3		The estimated concentration that yields a stimulation index of three
FCA	Freund's Complete Adjuvant	
GLP	Good Laboratory Practice	
GPMT	Guinea-Pig Maximization Test	
HCA	Hexyl Cinnamic Aldehyde	
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods	
LLNA	Local Lymph Node Assay	
OECD	Organization for Economic cooperation and Development	
PBS	Phosphate Buffered Saline	
RI	Radioactive Isotope	
SI	Stimulation Index	
SLS	Sodium Lauryl Sulfate	
SOP	Standard operating procedure	

目次	
はじめに .....	6
要約 .....	7
1. 背景 .....	8
1.1 皮膚感作性 .....	8
1.2 モルモットを用いた試験法 .....	8
1.3 LLNA 法 .....	8
1.4 LLNA-DA 法 .....	9
1.5 本研究にいたるまでの過程 .....	9
1.6 本研究の目的 .....	9
2. 方法 .....	10
2.1 組織と役割 .....	10
2.2 LLNA-DA の操作方法 .....	11
2.3 技術研修会 .....	12
2.4 ルミノメータの校正 .....	12
2.5 予備実験 .....	12
2.6 被験物質 .....	12
2.7 割付 .....	13
2.8 試料等の配布 .....	13
2.9 実験実施のスケジュール .....	13
2.10 データの管理 .....	14
2.11 データベース .....	14
2.12 データ解析の方法 .....	15
2.12.1 体重, リンパ節重量, ATP 発光量 .....	15
2.12.2 SI 値とその 95%信頼区間の算出 .....	15
2.12.3 施設内再現性、施設間再現性を評価する方法 .....	15
2.12.4 代替可能性の検討の方法 .....	15
2.12.5 EC3 の算出方法と刺激のカテゴリー .....	16
2.12.6 ソフトウェア .....	16
3 結果 .....	17
3.1 研究の質について .....	17
3.2 選択された被験物質と割付け結果 .....	17
3.3 データの取り扱いについて .....	18
3.4 背景基礎データ .....	21
3.4.1 体重 .....	21
3.4.2 ATP 発光量 .....	22

3.4.3	リンパ節重量と ATP 発光量の関係 .....	26
3.5	LLNA-DA の分析感度 .....	28
3.6	各被験物質の用量反応関係 .....	29
3.7	施設間の再現性 .....	31
3.8	施設内の再現性 .....	32
3.9	代替可能性 .....	33
3.9.1	感度, 特異度, 一致割合 .....	33
3.9.2	EC3 .....	35
4	議論 .....	36
4.1	本研究の位置づけと意義 .....	36
4.2	本研究で評価した LLNA-DA 法の操作上の特徴 .....	37
4.3	研究内の妥当性 .....	37
4.3.1	被験物質の選択 .....	37
4.3.2	データの質に関して .....	37
4.3.3	施設内再現性 .....	38
4.3.4	施設間再現性 .....	38
4.3.5	比較対照とした対象となる試験法のデータの妥当性 .....	39
4.3.6	対象となる試験法のデータとの対応性 .....	39
4.4	研究外の妥当性 .....	39
4.4.1	試験法の頑健性 .....	39
4.4.2	動物福祉面について .....	39
4.4.3	コストについて .....	40
4.5	評価委員による評価結果への返答としてのまとめ .....	40
4.6	SOP に関して .....	40
4.7	本研究の限界と今後の課題 .....	41
5.	結論 .....	42
	謝辞 .....	43
	参考文献 .....	44

## はじめに

本報告書は、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会により組織された LLNA-DA 法バリデーション研究実行委員会が実施したバリデーション研究の報告書である。

この研究は被験物質が遮蔽下で実施されており、本報告の作成時点で被験物質名は明らかにされていないため、被験物質は被験物質に割り振られたコードを用いて報告することとする。また、本報告では、研究の結果については実験実施施設名も割り振られたコードを用いて報告することにする。



## 要約

【目的】 LLNA (local lymph node assay) 法はマウスのリンパ節細胞増殖反応を<sup>3</sup>H-thymidine の取り込み量により皮膚感作性を評価する試験法であり、モルモットを用いた試験法 (GPMT/BT 法) の代替法として広く知られている。LLNA-DA は<sup>3</sup>H-thymidine の取り込み量の代わりに ATP 量を用いる方法であり、ラジオアイソトープの管理に厳しい本邦でも容易に実施できるという利点がある。本研究では、施設間再現性と代替可能性の検討を主目的とした LLNA-DA 法の多施設バリデーション研究を実施した。

【方法】 本研究は LLNA-DA 法の実験プロトコールに基づいて実施した。12 の被験物質のうち、3 物質は全 10 施設で、残りの 9 物質は 3 施設ごとに評価した。各被験物質をコード化し、3 用量に調製して各実験施設に送付した。溶媒対対照群の発光量に対する被験物質群の発光量の比 (stimulation index, SI 値) が 3 を超えた場合、陽性と判定した。

【結果と考察】 全施設で評価した 3 被験物質及び 3 施設で評価したその他の 5 被験物質については、施設間のばらつきは小さく、すべての施設の判定が一致した。施設間で判定が一致しなかった 4 物質中 2 物質は明らかな用量反応関係がみられたが、残りの 2 物質はばらつきが大きかった。この原因にはこれら被験物質の溶媒や被験物質の物性が影響している可能性があるかと推察された。GPMT/BT 法に対する LLNA-DA 法の感度、特異度、一致割合はそれぞれ 87.5% (7/8), 100% (3/3), 90.9% (10/11) であり、この結果は同じ被験物質の文献値で算出した GPMT/MT 法に対する LLNA-DA 法の感度、特異度、一致割合と同程度であった。

【結論】 本研究で実施した 12 の被験物質の濃度範囲で得られた結果は LLNA 法と同程度であり、キャッチアップバリデーション研究として受け入れられるものであると思われる。

## 1. 背景

### 1.1 皮膚感作性

アレルギー性接触皮膚炎 (ACD; Allergic Contact Dermatitis) は、外部からの化学物質等 (抗原) が繰り返し接触し皮膚から吸収され、感作された T リンパ球による反応である IV 型アレルギーにより接触部位に一致して炎症反応をきたしたものをいう。ACD は産業で使用される化学物質や消費者に使用される製品までのさまざまな化学物質と関連があることが知られている。このため、化学物質の感作性を評価することは、安全性評価において重要であると認識されている。

### 1.2 モルモットを用いた試験法

動物を用いた皮膚感作性試験では、長い間モルモットを用いた試験である Guinea-pig maximization test 法 (以下, GPMT 法) や Buehler test 法 (以下, BT 法) により実施されてきた (OECD (1992))。これらの試験法では、感作誘導を行い、一定期間後に惹起処置により感作し、皮膚反応を観察することによって感作性を評価する。評価方法は、肉眼判定によるため主観が入る可能性があると言われている。GPMT 法では、感度を高めるために通常 Freund's Complete Adjuvant (FCA) を被験物質と乳化して皮内投与することにより感作誘導を行うが、BT 法では FCA を用いない。

### 1.3 LLNA 法

近年、マウスを用いた感作評価方法として LLNA 法 (Local Lymph Node Assay) が開発され、現在までに多くの研究成果が広く報告されている (例えば Basketter and Scholes (1992), Basketter ら (2002), Haneke ら (2001))。また、この方法は OECD (Organization for Economic cooperation and Development) の安全性試験ガイドライン 429 としても承認されているだけでなく (OECD, 2002), ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) の Immunotoxicology Working group によるプロトコールとしても推奨されている (ICCVAM, 2001)。

十分な性能をもつ *in vitro* の試験系が研究の段階であり実用化に至っていない現時点では、LLNA 法はモルモットを使った試験系に比べて動物愛護の面でも優れているとされている (OECD, 2002)。

LLNA 法は感作誘導期のリンパ節細胞増殖反応を  $^3\text{H}$  で標識されたチミジンの DNA への取り込みを指標として皮膚感作性を評価する。しかし、我が国では RI (Radioactive Isotope) の取り扱い規制が厳しく、LLNA 法の普及が不十分

であるといわれている。

#### 1.4 LLNA-DA 法

ダイセル化学工業（株）は、リンパ細胞増殖を検出する指標を<sup>3</sup>Hで標識されたチミジンの代わりに ATP（Adenosine triphosphate）含量に改良した LLNA-DA 法を開発した（Yamashita ら（2005））。また、LLNA-DA 法では LLNA 法と同等の検出感度を得るため投与回数の変更がなされている。この試験法の SOP を資料 4「LLNA-DA 法プロトコール」に示す。

#### 1.5 本研究にいたるまでの過程

ダイセル化学工業（株）は、代替法に関する厚生労働科学研究班（主任研究者 大野泰雄）に評価を依頼するため LLNA-DA 法を新しい動物実験代替法として応募した。研究班ではこの方法が RI を用いないという利点以外にも簡便で、かつ時間のかからない方法であり、評価するに値する方法であると判断し、日本動物実験代替法学会評価委員会に評価を依頼した。その結果、LLNA-DA 法には複数の施設で実施されたバリデーション研究が必要とされ、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会の支援により、バリデーション研究を実施することとなった。これが本報告書で報告するバリデーション研究である。

なお、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」班の協力を得た。

#### 1.6 本研究の目的

本研究の目的は、LLNA-DA 法を被験物質遮蔽下で実施したときに、

- 1) 複数の施設間でどの程度一致するか（施設間再現性）、
  - 2) 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）
- を、多施設での実験を通して評価することである。

なお、2)の目的に対しては、GPMT/BT 法に対する LLNA-DA 法の代替可能性が、GPMT/BT 法に対する LLNA 法の代替可能性とどの程度一致するのかについて検討することを含む。

## 2. 方法

本研究の研究計画は、研究実施前に定められた研究計画書（別添 1）に従い実施された。

### 2.1 組織と役割

#### ・研究の組織

本研究を遂行するための研究組織、LLNA-DA 法バリデーション研究実行委員会（以下、LLNA-DA バリ実行委）は次の委員で構成された。

#### 1) 実験施設代表者

日本動物実験代替法学会バリデーション委員会が組織した研究に参加の意志を示した実験施設の代表者。実験施設から各 1 名。

#### 2) バリデーション委員会委員

日本動物実験代替法学会バリデーション委員会に属する数名。

#### 3) 技術担当として必要な委員

各実験施設から数名。

当初、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会が参加施設を公募したところ、19 の実験施設がバリデーション研究の参加を希望した。しかしながら、一度にこれだけの施設に動物および測定器の供給を行うことが不可能であったために、実験施設を選択せざるを得なかった。そこで、LLNA 法やそれに準じた試験法を実施した経験の有無、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会の評価委員会に委員が属するか否か、6 物質の被験物質が実施できるか否か、後に実施されることになっていた LLNA 法の別の変法である LLNA-BrdU 法への参加を希望するか否か、測定機器の所持状況などが勘案され、最終的に 10 施設がこの研究の実験を実施する施設となった。しかしながら、残りの 9 施設の代表者も LLNA-DA バリ実行委として本研究に参加することになった。

LLNA-DA バリ実行委を資料 1「LLNA-DA バリ実行委」に、実験参加施設とその実験担当者を資料 2「実験担当者一覧」に示す。

#### ・各組織の役割

LLNA-DA バリ実行委は、いくつかの担当を設けた。担当とその役割は以下のとおりである。

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、LLNA-DA 法の内容、SOP