

(Standard operating procedure), 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, 関連する資材と共に送付する。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。

実験参加施設代表者: 本実行委に所属し, 実験参加施設を代表する。

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。

実験責任者: 施設で実施された実験について責任を持つ。

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。

2.2 LLNA-DA の操作方法

資料4「LLNA-DA 法プロトコール」にもとづいて, この研究用に LLNA-DA バリ実行委が SOP を作成した。この SOP の最終版は資料5「LLNA-DA 法実験 SOP (Version 2.0)」に示すが, 本研究での実験手順の概略を以下に示す。

使用動物: 雌の CBA/JNCrlj マウス (8 週齢にて入荷)

投与群設定: 被験物質に合わせた溶媒を用いる陰性対照、陽性対照(25% HCA (Hexyl cinnamic aldehyde)), および 3 用量の被験物質

群あたり動物数: 1 群あたり 4 匹以上

溶媒: 事前に被験物質候補リスト (資料3) に記載された溶媒を用いて, 被験物質の濃度が調製され遮蔽下で送付される。

測定指標: ルシフェリン・ルシフェラーゼ法による耳介リンパ節の ATP 含量

試験操作: LLNA-DA 法では 3 日間連続で 1% SLS (sodium lauryl sulfate) 処置 1 時間後に被験物質溶液あるいは懸濁液をマウスの両耳介に塗布する。7 日目に 4 回目の塗布を行い, その 24 時間後に両耳介リンパ節を取り出し, 個体毎に重量を測定したのち, 2 枚のスライドグラスにはさんで押しつぶす。これを 1mL の PBS (phosphate buffered saline) に懸濁させる。この懸濁液を攪拌し, 膜組織を避けて 20 μ L サンプルングし, PBS 1.98mL

中に加える。これを 0.1mL 採取して約 20 秒間静止した後、発光試薬を添加してルミノメータにかけ、表示される ATP 発光量を測定する。

結果の判定：SI 値 (stimulation index) が 3 以上の時に感作性陽性とする。

1 回に実施する被験物質数：1 回の操作で 2 被験物質を実施する。(ただし、被験物質数のバランスをとる関係で、ある 1 施設に関しては 1 回の操作で 3 被験物質を実施したという例外がある。)

2.3 技術研修会

各実験施設の実験担当者が LLNA·DA 法の原理と操作法を理解できるように技術研修会を実施した。技術研修会では、研究計画書、SOP、記録用紙、データシートの説明と実験の操作方法の実施が行われた。各施設から少なくとも一人の実験担当者が、技術研修会に参加し、技術研修を受けた。

2.4 ルミノメータの校正

各実験施設は、予備実験を実施する前に別添 2「ルミノメーター校正標準作業手順 Version 2.0」に従い、ATP 標準試薬を用いたルミノメータの校正を実施した。10 施設中 1 施設のみが異なるメーカーの測定器を用いており、他の施設の結果と比べ若干低めの値を示していたことから、この施設も同種の機器を用いることとした。つまり、この研究ではすべての施設で同じ種類の測定器による測定が行われた。この結果すべての施設で同様な測定結果が得られたことを実験開始前に確認した。

2.5 予備実験

作成された SOP で十分な実験が行えるかどうかを確認するために、別添 3「LLNA·DA 法標準作業手順 (予備試験用) Version 1.5」に従い陽性対照のみを用いた予備実験を実施した。LLNA·DA 実行委は、予備実験の結果をもとに、SOP にしたがって実験を実施することができたか、陽性対照が陽性対照として機能しているか、施設間差がどの程度あるかを検討した。その結果、すべての施設で陽性対照物質は陽性と判断され、提案施設の背景データのばらつきと比べて極端に大きな施設感差が生じていなかったため、本実験を実施することに決めた。特に大きな問題が生じていなかったため、SOP に関して大きな変更は行わなかった。

2.6 被験物質

本研究は遮蔽下で行うこととされていたが、実験者の安全性を確保するために、被験物質の候補リストを公開し、その中から被験物質を選択することにした。被験物質の候補リストは被験物質選定担当者により作成され、研究の開始

前にすべての研究者に伝えられた。被験物質の候補は、既知データが豊富で、LLNA 法の実験結果が存在するものを採用することとされた。被験物質の候補リストを資料 3「被験物質の候補リスト」に示す。

実験施設に属さない被験物質選定担当者が、皮膚感作性の程度のバランスを考慮して最終的に 12 の被験物質を選択した。選択された被験物質は、LLNA の結果を参考に 3 つの濃度が設定された。これらの被験物質はあらかじめ濃度が調製された後に遮蔽化され、対応する溶媒とともに各実験施設に送付された。

2.7 割付

被験物質割付担当者は、表 2.1 に概念的に示すように、被験物質選定担当者が選択した被験候補物質のうち 3 物質を標準被験物質とし全実験施設に、その他の被験物質については、物質の感作性の程度と用いる溶媒のバランスを考慮して 3 施設に割り付けた。

表 2.1 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			○	○
...				...

2.8 試料等の配布

試料等手配担当者は、各被験物質の試料溶液を調製し、実験参加施設に配布した。

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った。

2.9 実験実施のスケジュール

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）で技術研修会を実施した。

予備実験は、2006年2月27日～3月22日の間に実施した。

本実験は、2006年4月3日～7月5日の間に実施した。

別添4「実験実施期間プラン」に動物入荷と実験実施のスケジュールを示す。

2.10 データの管理

記録用紙

各実験施設は実験の記録・結果をSOPにもとづき作成された所定の記録用紙（別添5「LLNA-DAバリデーション研究記録用紙」）に記録した。作成した記録用紙は、

- ・ 機器校正・動作確認記録
- ・ 試薬使用記録
- ・ 動物適用記録
- ・ 試験液使用記録
- ・ 最終実験記録

の項目からなる。

データシート

データ解析担当者は、データ解析のために、個々の動物より得られる測定結果（体重、リンパ節重量、ATP測定量）を入力するデータシート（別添6「データシート」）を作成した。各実験施設にはデータシートには被験物質のコードが記載されたファイルが各実験担当者に送付され、実験担当者は実験の測定結果を入力した。データ解析はここに入力されたデータに基づいて実施されている。

データクリーニング

データ解析担当者は、収集したデータシートに必要なデータが入力されていないなかったり、入力された値やコメントに疑義が生じた場合には、該当施設の実験担当者に連絡をとり内容を確認し、必要に応じて適切な値を入力したデータファイルの再提出を求めた。

2.11 データベース

データ解析担当者は、データクリーニングが終わった個々のデータシートからデータを読み込むプログラムを作成しデータベースを作成した。本報告の結果はこのデータベースのデータに基づいている。

2.12 データ解析の方法

2.12.1 体重, リンパ節重量, ATP 発光量

体重 (1 日目と 8 日目), リンパ節重量, ATP 発光量は基本統計量 (平均, 標準偏差など) を算出した. ATP 発光量は 1 個体あたり 2 つの繰り返しによる測定値が得られるが, 2 つの値の平均値を解析に用いた.

2.12.2 SI 値とその 95%信頼区間の算出

主なデータ解析は, 被験物質または陽性対照の ATP 発光量と溶媒の ATP 発光量の比で算出される SI (Stimulation Index) 値に基づき実施した. SI 値は, 個々の実験の各用量ごとにひとつの値が得られる. SI 値の近似的な 95%信頼区間は, 別添 7 「SI 値とその 95%信頼区間の計算法」に示す方法により得ることができる.

2.12.3 施設内再現性, 施設間再現性を評価する方法

施設内再現性, 施設間再現性は, 対数変換を施した SI 値の分散に基づいた指標で評価することにする. 個々の実験で得られる SI 値は実験内差を含んでいる. そこで, 施設間再現性の指標を算出する際に, 対数変換後の SI 値の実験内のばらつきを考慮した施設間分散を算出し, 指数をとることで指標を算出した. 本報告書ではこの指標を $\exp(\tau^2)$ と表記することにする. $\exp(\tau^2)$ の計算は, 対数変換を施した SI 値について施設間差を変量効果としたメタ・アナリシスの手法に基づいている (Normand (1999)). $\exp(\tau^2)$ の最小値は 1 であり, この値が 1 に近いことは施設間のばらつきがほとんどないことを示す. 施設間差が大きくなるとこの値は大きくなる. この方法の詳細については別添 8 「SI 値を用いた施設間再現性, 施設内再現性の指標の算出法」に示した. 施設間差の評価は同一物質の同一濃度について行った.

施設内再現性については, ある施設の繰り返し測定された SI 値が必要となる. この研究では陽性対照物質を用いてこれを行うことが可能である. 施設間再現性の評価の指標も $\exp(\tau^2)$ を用いた.

2.12.4 代替可能性の検討の方法

代替可能性の指標として, GPMT 法もしくは BT 法による判定 (以下, GPMT/BT 法), LLNA 法のそれぞれの方法に対する感度, 特異度, 一致割合, 陽性予測度, 陰性予測度を算出した.

本研究はバリデーション研究であるため, 同一物質の同一濃度での実験を複数の施設で行っている. 同一物質, 同一濃度についてただ一つの代表値を得る

ために、対数変換を施した SI 値の重み付平均を求めた後、指数をとることを行った。重み付き平均は、変量効果を用いたメタ・アナリシスにより算出した（別添 8）。いずれかの濃度で重み付き平均が 3 を超えた場合に陽性、そうでない場合に陰性と判定した。そして、この判定に基づき上記の代替可能性の指標を求めた。

2.12.5 EC3 の算出方法と刺激のカテゴリー

上記の方法で得た各濃度の SI 値の重み付き平均が 3 となる濃度の予測値を EC3 として算出した。算出法は Gerberick ら（2004）に準じ、(1)すべての濃度で SI 値が下回る場合は算出せず、(2)いずれかの 2 用量間で SI 値の重み付き平均が 3 を挟む場合には直線補間により算出、(3)すべての用量で SI 値の重み付き平均が 3 を上回る場合には、3 に近い 2 つの濃度の SI 値の重み付き平均を用いて、底が 2 の対数変換した値について直線補間して算出した。また、算出した EC3 に基づき、表 2.1 に示す感作性のカテゴリーを決め（Gerberic ら（2004））、このカテゴリーで LLNA 法と LLNA-DA 法を比べた。

表 2.1 EC3 と感作性のカテゴリー

EC3 (%)	感作性の カテゴリー
算出不可能	Negative
$\geq 10 - \leq 100$	Week
$\geq 1 - < 10$	Moderate
$\geq 0.1 - < 1$	Strong
< 0.1	Extreme

2.12.6 ソフトウェア

2.12.1 から 2.12.5 までの解析は、SAS version 9 を用いて行った。

3 結果

3.1 研究の質について

研究の質を確保するために、以下のことを実施した。

- ・記録用紙のチェック
- ・データクリーニング
- ・技術移転の実施
- ・ルミノメータの校正のチェック
- ・計画書、SOP の改訂経過の記録

3.2 選択された被験物質と割付け結果

表 3.2.1 に各施設への被験物質の割付結果を示す。基本的には 1 施設あたり 6 被験物質を実施したが、施設 No.9 と No.10 は施設のスケジュールの関係で 4 被験物質のみを実施した。すべての被験物質が 3 施設以上の施設で実験するようにしたため、施設 1 は 7 被験物質物質分の実験を実施した。

表 3.2.1 被験物質の割付

被験物質 割付コード	感作性*	施設No.									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	+	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	+	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	+	○		○					○		
D	+	○	○			○					
E	+				○		○		○		
F	+				○	○				○	
G	+	○	○			○					
H	-	○		○				○			
I	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
J	-				○		○		○		
K	+		○				○	○			
L	-			○				○			○

*:LLNA法の評価結果に基づく感作性の判定

3.3 データの取り扱いについて

析出、沈殿等について

複数の被験物質に析出や沈殿がみられた。しかし、同じ被験物質でも施設により析出・沈殿がみられたり、そうでなかったりしていることが判明した。明らかな原因は不明であるが、被験物質を入れた容器がプラスチックであったため、溶媒として AOO (Acetone/olive oil) を用いると容器が溶ける可能性が示唆された。被験物質の状態とその対処は施設により異なっていた (表 3.3.1)。

溶媒の誤送付について

実験実施期間中、1 施設 (施設5) に溶媒を誤って送付されていたことが明らかになった。その被験物質の溶媒は AOO であったが、DMSO が送られていた。この施設に被験物質が送付される際に、他の施設にも被験物質が送られていたが、その施設のみ溶媒が誤送されたのか、他の施設に送るはずの溶媒と入れ替わっていたのかを明らかにすることはできなかった。送られるべき被験物質リストに記載された適切な溶媒は AOO であった。AOO が陽性対照物質の溶媒であるため、誤送が明らかとなったその施設の被験物質の溶媒のデータに限り、同じ実験で実施された陽性対照の溶媒 (AOO) のデータを被験物質の溶媒のデータとみなして解析を行うこととした。

被験物質 E の取り扱い

被験物質 E を実験した施設 4 では、高濃度群で 3 回目の塗布の翌日に 4 匹中 2 匹の動物が死亡した。さらに残り 2 匹の動物も自発運動の低下が認められた。この報告を受けた時点で被験物質 E が割り付けられた他の 2 施設 (施設 6, 施設 9) は実験実施前であったため、この 2 施設については施設 4 で実施した中濃度を高濃度に、低濃度を中濃度とし、新たに低濃度が再設定された。以下、本報告では被験物質 E については再設定された濃度について報告する。

入力時の被験物質コードの改変

データシートにはあらかじめアルファベットで示された被験物質コードが記入され各施設に配布された。しかし、データシートに記入された被験物質コードとは異なる被験物質の値が入力されるという入力ミスが複数の施設で見られた。この原因は、データシートで定義した通りに、実験担当者が被験物質を群に割り付けずに、アルファベット順に割り付けたことによる。これらの誤りは、問い合わせにより適切に修正された。

データクリーニングの結果

実験担当者は、実験中に測定した ATP 発光量などを、データシートをプリントアウトしたものに書き込み、後に電子ファイルのデータシートに入力した。データ解析担当者は、測定値を記入したプリントアウトを集め、入力された電子ファイルのデータシートの値との整合性の確認を行った。値が異なった場合、各施設への問い合わせが行ない、最終的な値が決めた。

表 3.3.1 被験物質の状態と取り扱い

物質記号	施設	問題点	処理事項
A	1	-	-
	9	-	-
	2	-	-
	5	-	-
	8	-	-
	10	-	-
	6	-	-
	7	-	-
	4	-	-
	2	-	-
B	1	-	-
	9	-	-
	2	-	-
	5	-	-
	8	-	-
	10	-	-
	6	-	-
	7	-	-
	4	-	-
	2	-	-
C	1	2層分離、白色析出	超音波処理、高濃度は白色固体の残留あり
	8	析出	攪拌、懸濁適用
	3	沈殿	混和適用
D	1	-	-
	2	-	-
	5	-	-
E	4	沈殿	混ぜながら適用
	6	結晶	超音波処理、溶解確認後適用
	8	析出	攪拌、懸濁適用
F	4	-	-
	5	-	-
	9	-	-
G	1	-	-
	2	-	-
	5	-	-
H	1	白色結晶	室温攪拌
	3	析出	投与部位で析出あり
	7	-	-
I	1	析出(膜状)	超音波処理
	9	沈殿	十分溶解しない
	2	-	-
	5	析出	混和適用
	8	-	-
	10	-	-
	6	-	-
	7	-	-
	4	-	-
	2	-	-
J	4	沈殿	混ぜながら適用
	6	結晶	超音波処理、溶解確認後適用
	8	析出	攪拌、懸濁適用
K	6	析出	超音波処理
	2	析出と粘性	超音波処理、粘性により均一適用は困難
	7	析出	混和適用
L	3	-	-
	7	-	-
	10	-	-

3.4 背景基礎データ

3.4.1 体重

実験開始1日目, 8日目の動物の体重の基本統計量をそれぞれ表3.4.1, 表3.4.2に示す.

施設によっては1日目に比べ8日目の方が体重がやや増えている傾向がみられたが, 全体として施設間の大きな変動はみられなかった.

表 3.4.1 実験開始1日目の動物の体重 (g) の基本統計量

施設	データ数	平均値	標準偏差	最小値	25%点	中央値	75%点	最大値
1	120	22.0	1.5	19.3	20.9	21.8	23.1	27.1
2	108	22.5	1.3	19.4	21.5	22.6	23.5	25.0
3	108	22.0	1.2	18.2	21.4	22.0	22.8	24.8
4	108	22.7	1.4	20.0	21.8	22.5	23.7	26.7
5	108	21.6	1.1	19.1	20.7	21.6	22.4	24.4
6	108	21.7	1.4	19.3	20.6	21.7	22.7	24.9
7	108	22.8	1.4	18.5	21.7	22.8	23.9	25.9
8	108	23.4	1.5	20.5	22.3	23.3	24.4	28.6
9	72	23.0	1.2	20.1	22.4	22.9	23.8	26.5
10	72	22.6	1.4	19.8	21.4	22.5	23.7	25.8

表 3.4.2 実験開始8日目の動物の体重 (g) の基本統計量

施設	データ数	平均値	標準偏差	最小値	25%点	中央値	75%点	最大値
1	120	22.1	1.5	19.0	20.9	22.0	23.2	26.1
2	108	23.4	1.4	20.6	22.5	23.3	24.5	26.7
3	108	23.2	1.4	19.8	22.3	23.2	24.2	26.6
4	104	23.4	1.4	20.4	22.2	23.3	24.5	27.1
5	108	23.0	1.3	20.1	21.9	23.0	23.8	25.8
6	108	22.2	1.4	19.2	21.2	22.2	23.1	25.6
7	108	23.0	1.5	17.1	21.7	23.0	24.0	26.0
8	108	23.9	1.8	20.1	22.3	24.0	25.1	29.2
9	72	23.9	1.3	20.9	23.1	23.9	24.6	27.0
10	72	23.3	1.3	20.7	22.3	23.3	24.4	26.8

3.4.2 ATP 発光量

表 3.4.3 に各物質の溶媒および用量ごとの ATP 発光量の平均と標準偏差 (sd) を示す。

10 施設が実施した被験物質 A と B, 3 施設が実施した被験物質 D, E, F, K, L ではすべての施設で用量の増加とともに ATP 発光量が増加した。被験物質 G では 3 施設中 2 施設に, 被験物質 J では 3 施設中 1 施設でこの傾向がみられた。被験物質 H (3 施設) と I (10 施設) では, 全ての施設で用量反応関係が明確ではなかった。

被験物質 E と J については溶媒の値の施設間差が大きく, 施設 4 と 6 では 2 桁の違いがみられる (この 2 物質については 1 回の実験で実施されたため, 溶媒の値は同一となっている)。この 2 物質については他とは異なる溶媒が用いられたことを注記しておく。

表 3.4.3.a ATP 発光量 (被験物質 A)

		施設														
		1			2			3			4			5		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
A	溶媒	4	27188	10027	4	26159	2157	4	35610	7212	4	42866	9956	4	11899	7366
	低濃度	4	77305	25181	4	60843	19746	4	80548	34265	4	127990	23651	4	18107	3203
	中濃度	4	147161	32102	4	70451	26337	4	150579	23446	4	210206	57119	4	45691	21305
	高濃度	4	325485	46981	4	241465	73709	4	354678	27371	4	365768	51573	4	166224	43333

		施設														
		6			7			8			9			10		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
A	溶媒	4	13910	3921	4	22466	3515	4	20576	5546	4	26842	9515	4	53350	14893
	低濃度	4	38247	10833	4	86083	21219	4	49730	22738	4	75290	20086	4	62000	23941
	中濃度	4	59302	19598	4	121021	23461	4	62571	30199	4	112282	36388	4	112163	22420
	高濃度	4	210636	46213	4	296024	33270	4	259203	#####	4	292230	5423	4	251172	40569

表 3.4.3.b ATP 発光量 (被験物質 B)

		施設														
		1			2			3			4			5		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
B	溶媒	4	24583	5761	4	41189	17452	4	35652	12253	4	43007	8931	4	19146	6582
	低濃度	4	33196	6535	4	56291	5484	4	48383	14959	4	64212	6709	4	23417	6260
	中濃度	4	73884	14255	4	109204	15298	4	82040	12032	4	138873	51932	4	35432	14357
	高濃度	4	142130	29633	4	198520	40800	4	158304	26958	4	219687	29834	4	76029	5733

		施設														
		6			7			8			9			10		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
B	溶媒	4	16375	3953	4	29925	6142	4	12207	4127	4	29602	8049	4	29077	2876
	低濃度	4	27369	8594	4	46148	14005	4	16616	4630	4	25602	11242	4	40685	14674
	中濃度	4	38327	9530	4	126755	35639	4	50829	8197	4	65640	27871	4	79321	10548
	高濃度	4	90067	27828	4	212285	50835	4	124803	34287	4	114791	13669	4	101984	21546

表 3.4.3.c ATP 発光量 (被験物質 C)

		施設								
		1			3			8		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
C	溶媒	4	27188	10027	4	24047	3932	4	20576	5546
	低濃度	4	47591	2668	4	33875	4945	4	25167	4299
	中濃度	4	63021	9400	4	42352	11487	4	40921	10896
	高濃度	4	76927	15323	4	41759	8243	4	49037	8244

表 3.4.3.d ATP 発光量 (被験物質 D)

		施設								
		1			2			5		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
D	溶媒	4	17947	4929	4	38044	13217	4	16439	6488
	低濃度	4	25594	9403	4	28096	9168	4	17024	5163
	中濃度	4	72748	20584	4	48980	8745	4	40319	17078
	高濃度	4	89767	21798	4	129110	31985	4	42237	6048

表 3.4.3.e ATP 発光量 (被験物質 E)

		施設								
		4			6			8		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
E	溶媒	4	100396	24632	4	4184	2395	4	19803	4451
	低濃度	-	-	-	4	44002	30922	4	87562	13336
	中濃度	4	203895	24479	4	44465	23293	4	131004	34534
	高濃度	4	267172	52088	4	85978	24933	4	159808	13473

表 3.4.3.f ATP 発光量 (被験物質 F)

		施設								
		4			5			9		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
F	溶媒	4	42866	9956	4	11899	7366	4	26842	9515
	低濃度	4	125838	22236	4	22896	7449	4	69256	20292
	中濃度	4	175277	10289	4	23619	8830	4	86598	20489
	高濃度	4	262118	34406	4	117098	5209	4	190392	38486

表 3.4.3.g ATP 発光量 (被験物質 G)

		施設								
		1			2			5		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
G	溶媒	4	17947	4929	4	38044	13217	4	16439	6488
	低濃度	4	52214	10965	4	64467	11056	4	19510	5239
	中濃度	4	51405	13007	4	115143	20638	4	30959	12804
	高濃度	4	86934	33682	4	120966	21688	4	44219	7822

表 3.4.3.h ATP 発光量 (被験物質 H)

		施設								
		1		3		7				
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
H	溶媒	4	27188	10027	4	35610	7212	4	22466	3515
	低濃度	4	36534	10199	4	35710	8126	4	28306	4047
	中濃度	4	31200	10875	4	34357	8364	4	25555	3074
	高濃度	4	30030	10456	4	23900	3733	4	23583	3751

表 3.4.3.i ATP 発光量 (被験物質 I)

		施設														
		1		2		3		4		5						
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差			
I	溶媒	4	24583	5761	4	41189	17452	4	35652	12253	4	43007	8931	4	19146	6582
	低濃度	4	37756	12448	4	37286	9163	4	36155	7444	4	67307	12946	4	10106	3170
	中濃度	4	27101	2623	4	35024	4878	4	23465	7953	4	38859	7172	4	14531	1549
	高濃度	4	28723	3313	4	33259	7651	4	30822	4465	4	34382	6421	4	13581	3696

		施設														
		6		7		8		9		10						
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差			
I	溶媒	4	16375	3953	4	29925	6142	4	12207	4127	4	29602	8049	4	29077	2876
	低濃度	4	32233	26281	4	43446	17986	4	14797	2984	4	18791	7645	4	26480	4594
	中濃度	4	14762	5342	4	27285	10469	4	12387	3421	4	20627	6175	4	30676	5707
	高濃度	4	21360	4957	4	24776	3613	4	13551	1001	4	15039	3697	4	36216	4960

表 3.4.3.j ATP 発光量 (被験物質 J)

		施設								
		4		6		8				
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
J	溶媒	4	100396	24632	4	4184	2395	4	19803	4451
	低濃度	4	116266	22468	4	21990	7141	4	69077	14602
	中濃度	4	153074	35051	4	27966	6162	4	60881	7880
	高濃度	4	103595	20343	4	49303	14901	4	50568	9846

表 3.4.3.k ATP 発光量 (被験物質 K)

		施設								
		2		6		7				
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
K	溶媒	4	26159	2157	4	13910	3921	4	21546	13493
	低濃度	4	55039	8805	4	25277	9139	4	40328	8389
	中濃度	4	91706	17069	4	57615	12621	4	85821	24030
	高濃度	4	121351	36474	4	110697	29265	4	81818	24819

表 3.4.3.1 ATP 発光量 (被験物質 L)

		施設								
		3			7			10		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
L	溶媒	4	24047	3932	4	21546	13493	4	53350	14893
	低濃度	4	25764	7330	4	23459	7751	4	33663	5192
	中濃度	4	26361	6381	4	38158	6803	4	41698	7559
	高濃度	4	37359	10622	4	29881	11569	4	44426	13600

表 3.4.3.m ATP 発光量 (陽性対照)

		施設														
		1			2			3			4			5		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
陽性対照	溶媒	12	23639	5906	12	30284	11576	12	25429	5894	12	44371	9224	12	15183	5554
	物質蒸	12	147032	30059	12	153995	35670	12	144091	18550	12	243877	42495	12	72877	19820

		施設														
		6			7			8			9			10		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
陽性対照	溶媒	12	10447	4413	12	25112	8035	12	18428	4503	8	26327	5484	8	22309	6393
	物質蒸	12	84748	16459	12	136327	26932	12	101382	22894	8	140388	23895	8	113209	18835

3.4.3 リンパ節重量とATP発光量の関係

リンパ節重量とATP発光量の間を関係を図3.4.1に示す。リンパ節重量とATP発光量の間には直線的な関係があることがわかる。ATP発光量は時間の経過とともに減少するので、操作時間を概ね一定にしなければ適切な値を得ることができない。被験物質の影響が強いほどリンパ節重量は増加するので、ATP発光量とリンパ節重量の間には直線的な関係がみられることは、各施設とも操作時間が厳密に遵守され、適切な操作で行われたことを示しているといえるであろう。

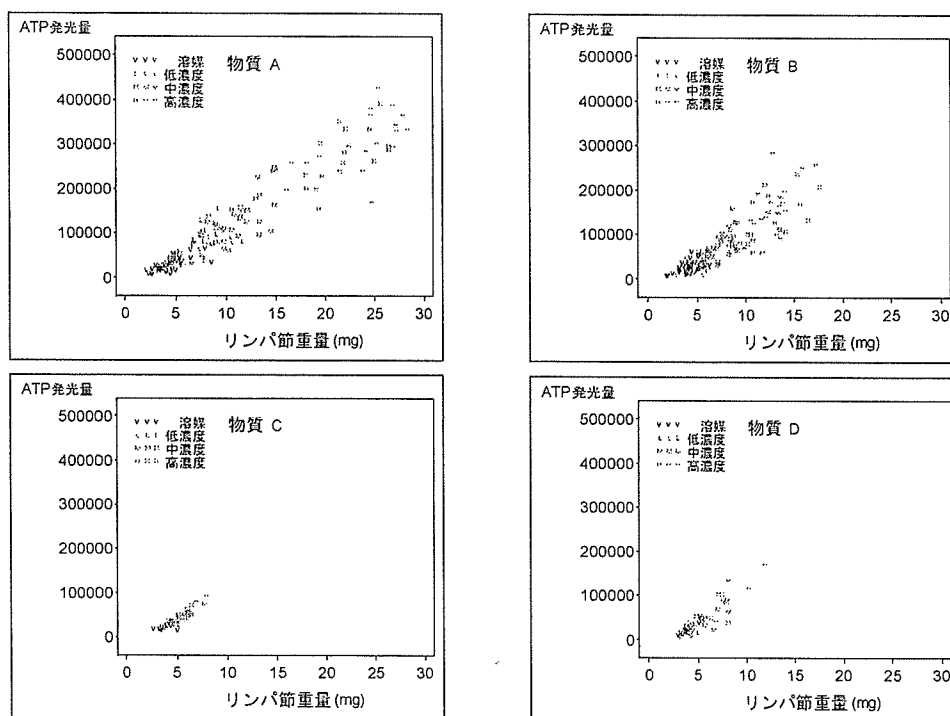


図 3.4.1 リンパ節重量とATP発光量の関係

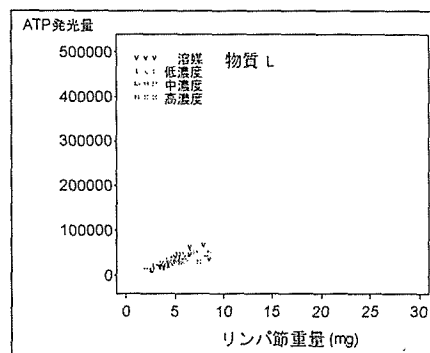
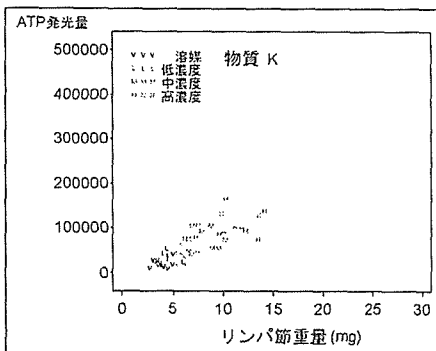
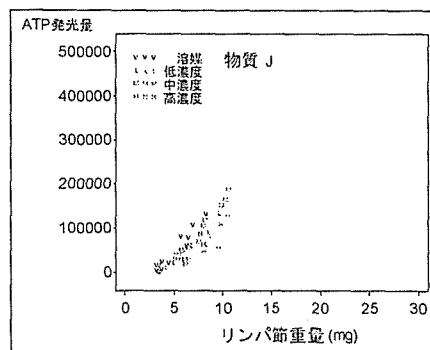
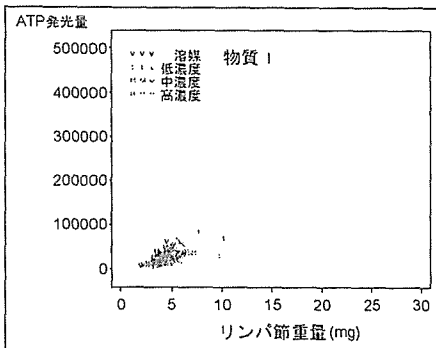
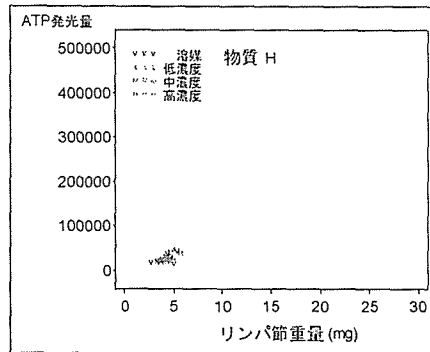
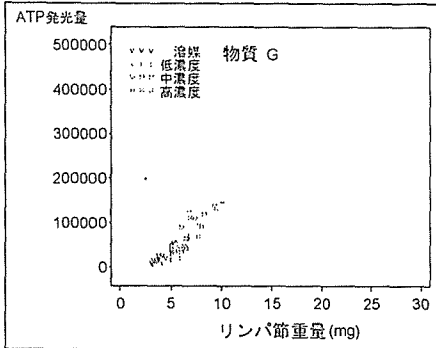
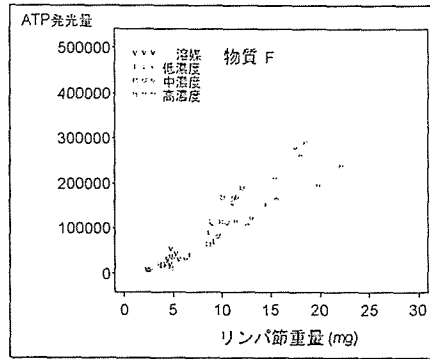
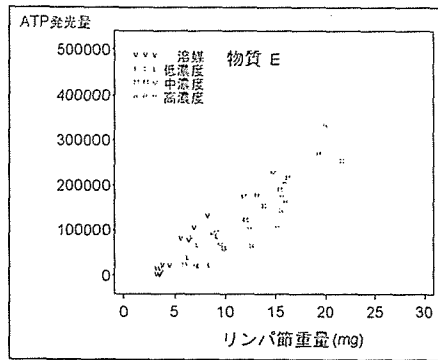


図 3.4.1 リンパ節重量と ATP 発光量の関係 (つづき)

3.5 LLNA-DA の分析感度

本報告書では、分析感度を陽性対照物質が適切に陽性と判定される能力と定義する。図 3.5.1, 図 3.5.2 にそれぞれ予備実験, 本実験における各実験の陽性対照物質の SI 値とその 95%信頼区間を示す。

これらの図よりいずれも陽性と判定する基準値である SI 値 3 を超えていることがわかる。従ってこの試験法は十分な分析感度を持つといえるであろう。

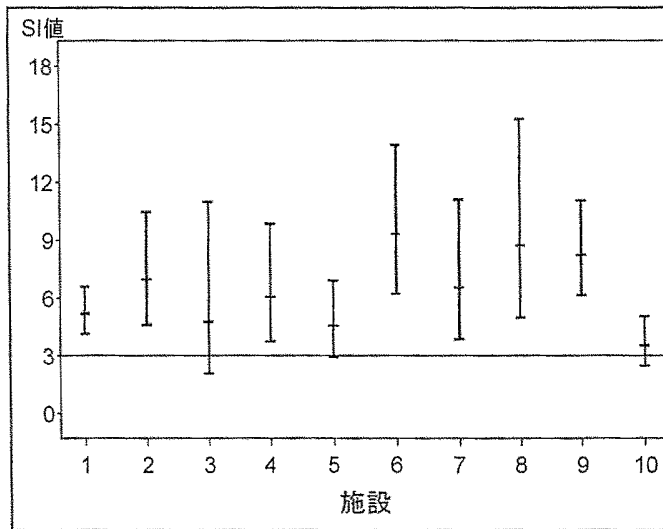


図 3.5.1 予備実験における陽性対照の SI 値とその 95%信頼区間

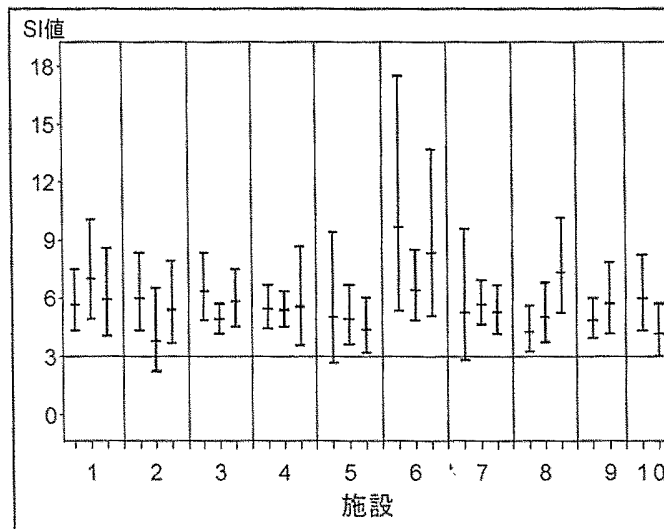


図 3.5.2 本実験における陽性対照の SI 値とその 95%信頼区間

3.6 各被験物質の用量反応関係

図 3.6.1 に SI 値の用量反応関係を示す。図中 con と示されているのは、メタ・アナリシスによる SI 値の重み付き平均を示している。

被験物質 A, B, F, K では各施設で明確な用量反応関係がみられ、高濃度での SI 値は 3 を超えている。被験物質 H, I, L は実施された濃度の範囲では SI 値の値は小さく、用量反応関係は明確ではなく、陰性物質であることが示唆される。被験物質 C は 3 施設すべてで SI 値が 3 よりも小さくなったが、施設 1 と 8 では SI 値は 3 にきわめて近い値となった。被験物質 D と G では高濃度で SI 値が 3 を超える施設とそうではない施設があった。しかし、用量反応関係がみられ 3 を超えなかった施設の SI 値は高濃度で 3 に近い値をとっている。個々の施設の結果を統合した重み付き平均の結果は高濃度で 3 を超えるものとなった。溶媒の値が施設によって大きく異なった被験物質 E と J は施設により結果が大きく異なった。被験物質 E では施設間差が重み付き平均に影響し用量反応関係は V 字型となっている。

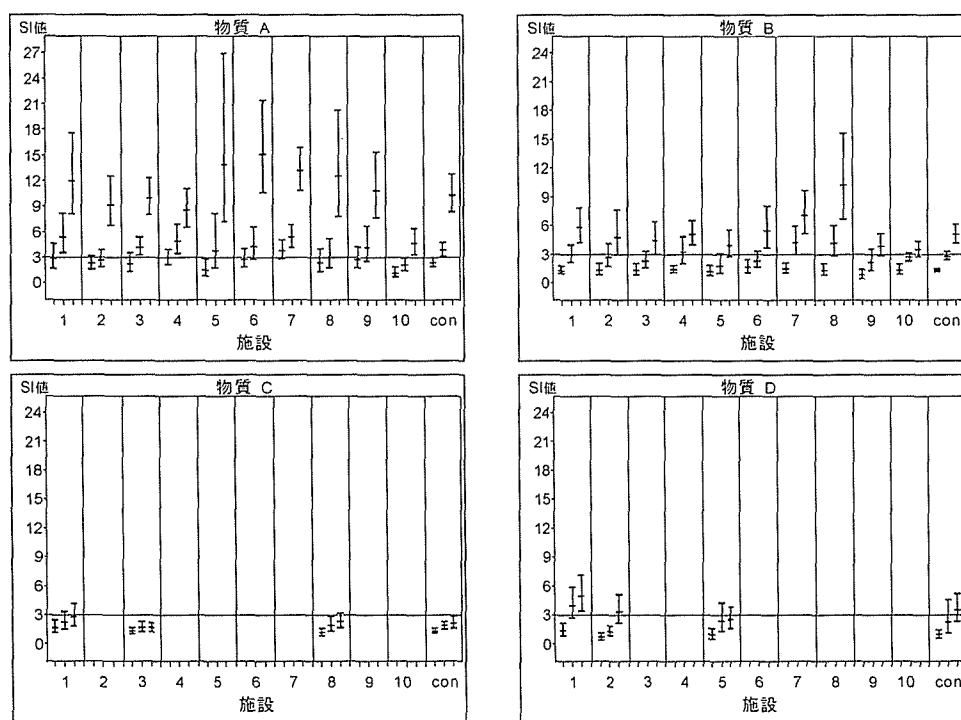


図 3.6.1 SI 値の用量反応関係

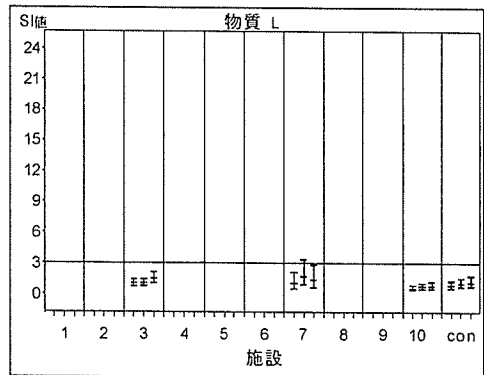
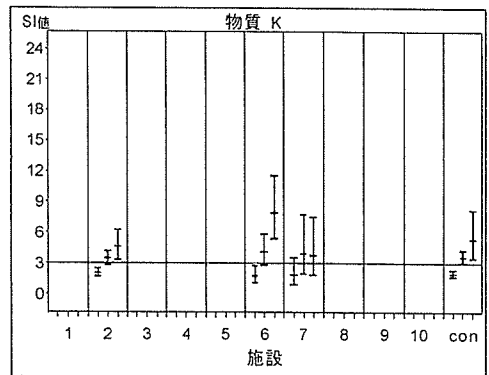
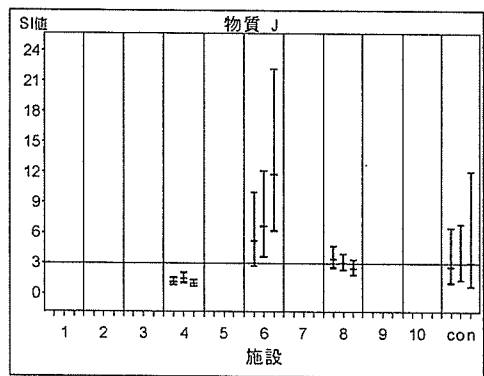
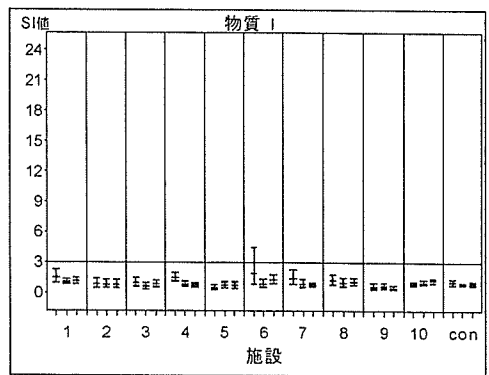
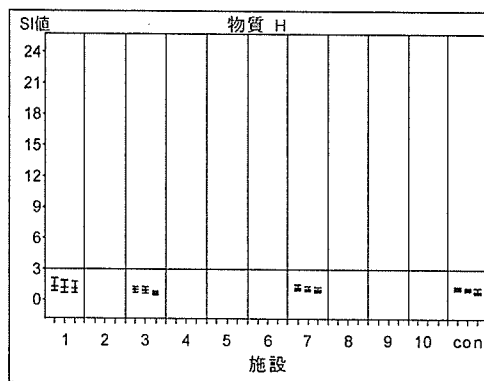
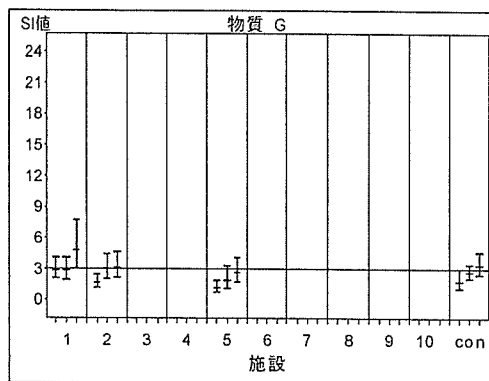
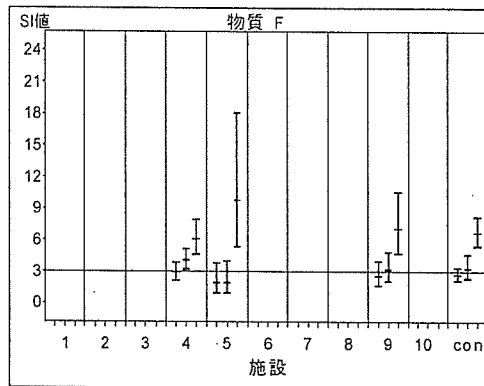
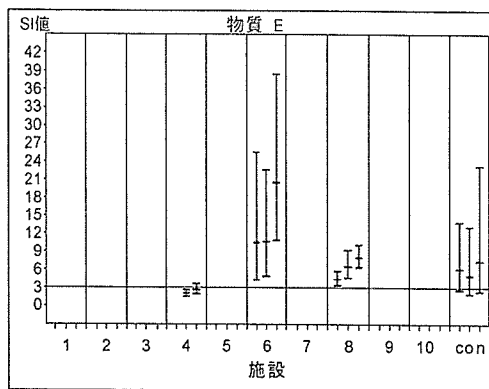


図 3.6.1 SI 値の用量反応関係 (続き)