

3.7 施設間の再現性

施設間再現性は、 $\exp(\tau^2)$ に基づき評価した。各被験物質のSI値（図 3.6.1）から計算した $\exp(\tau^2)$ の値と重み付き平均、その95%信頼区間を表 3.7.1に示す。

$\exp(\tau^2)$ の値がいくらであれば施設間差が大きいと判断するというような基準値は特にはないが、図 3.6.1 と施設間分散の値をみると施設間分散がおよそ 1.2 より小さい場合にはばらつきは小さく施設間差は大きくはないといえるであろう。仮に 1.2 を基準とするとこの値より大きな値をとっているのは、被験物質 E と J のすべての濃度、被験物質 D の中濃度である。

表 3.7.1 各被験物質のばらつきの指標施設間分散の値

被験物質	低濃度			中濃度			高濃度		
	SI値	95%信頼区間	$\exp(\tau^2)$	SI値	95%信頼区間	$\exp(\tau^2)$	SI値	95%信頼区間	$\exp(\tau^2)$
A	2.47	(2.00 , 3.04)	1.07	3.88	(3.14 , 4.8)	1.08	10.34	(8.36 , 12.79)	1.09
B	1.39	(1.24 , 1.56)	1.00	2.84	(2.45 , 3.3)	1.03	5.08	(4.20 , 6.15)	1.07
C	1.42	(1.21 , 1.66)	1.00	1.97	(1.61 , 2.4)	1.00	2.20	(1.65 , 2.92)	1.04
D	1.03	(0.71 , 1.51)	1.06	2.33	(1.19 , 4.6)	1.36	3.56	(2.42 , 5.24)	1.08
E	6.12	(2.69 , 13.93)	1.30	5.01	(1.91 , 13.2)	1.95	7.43	(2.37 , 23.27)	2.64
F	2.71	(2.16 , 3.40)	1.00	3.35	(2.39 , 4.7)	1.05	6.72	(5.47 , 8.25)	1.00
G	1.84	(1.10 , 3.06)	1.18	2.71	(2.13 , 3.4)	1.00	3.41	(2.47 , 4.69)	1.03
H	1.19	(1.01 , 1.40)	1.00	1.09	(0.93 , 1.3)	1.00	0.90	(0.65 , 1.24)	1.06
I	1.07	(0.84 , 1.36)	1.11	0.92	(0.82 , 1.0)	1.00	0.92	(0.77 , 1.1)	1.06
J	2.69	(1.11 , 6.52)	1.75	3.06	(1.36 , 6.9)	1.60	3.07	(0.78 , 12.12)	4.15
K	2.05	(1.75 , 2.40)	1.00	3.67	(3.10 , 4.3)	1.00	5.41	(3.54 , 8.27)	1.09
L	0.87	(0.59 , 1.28)	1.08	1.07	(0.72 , 1.6)	1.08	1.21	(0.79 , 1.85)	1.09

3.8 施設内の再現性

各施設の各実験から得られた陽性対照の SI 値 (図 3.5.2) について, 施設ごとに $\exp(\tau^2)$ を計算した結果を表 3.8.1 に示す. この計算には予備実験の陽性対照は含めていない.

陽性対照物質の $\exp(\tau^2)$ はすべての施設で小さい値であった。

表 3.8.1 陽性対照による施設内再現性

施設	SI値	95%信頼区間	$\exp(\tau^2)$
1	6.11	(5.07 , 7.37)	1.00
2	5.37	(4.29 , 6.73)	1.00
3	5.54	(4.70 , 6.53)	1.01
4	5.46	(4.81 , 6.19)	1.00
5	4.73	(3.85 , 5.82)	1.00
6	7.35	(5.73 , 9.42)	1.01
7	5.54	(4.78 , 6.42)	1.00
8	5.38	(3.97 , 7.29)	1.05
9	5.15	(4.33 , 6.12)	1.00
10	5.03	(3.55 , 7.13)	1.04

3.9 代替可能性

3.9.1 感度, 特異度, 一致割合

表 3.9.1 は, この研究で用いられた被験物質でモルモットを用いた GPMT/BT 法と LLNA-DA 法の分割表である. LLNA-DA 法の判定は, SI 値の重み付き平均に基づいている. 被験物質が 11 しかない理由は, 被験物質 D は GPMT/BT 法の結果がないためである.

表 3.9.2 は LLNA-DA 法と被験物質リストに結果が記載されている LLNA 法の分割表である.

表 3.9.3 は被験物質のリストに記載されている LLNA 法と GPMT/BT 法の判定結果を用いて, 選択した 11 物質で構成した分割表である. この表に基づいて計算した LLNA 法の代替可能性の能力 (感度や特異度など) は, 表 3.9.1 に基づいて計算した値とを比較する際に用いることができる.

表 3.9.1 GPMT-BT 法と LLNA-DA 法の分割表

		LLNA-DA法		合計
		+	-	
GPMT/BT法	+	7	1	8
	-	0	3	3
合計		7	4	11

表 3.9.2 LLNA-DA 法と LLNA 法の分割表

		LLNA-DA法		合計
		+	-	
LLNA法	+	7	1	8
	-	1	3	4
合計		8	4	12

表 3.9.3 GPMT-BT 法と LLNA 法の分割表

		LLNA法		合計
		+	-	
GPMT/BT法	+	7	1	8
	-	0	3	3
合計		7	4	11

表 3.9.4 に表 3.9.1 から表 3.9.3 により計算された感度，特異度，一致割合，陽性予測度，陰性予測度の値を示す。

この表からわかるように検討した被験物質の範囲で LLNA-DA 法は LLNA 法と同等の代替可能性を有しているといえるであろう。

表 3.9.4 代替可能性の指標

	n	感度	特異度	一致割合	陽性予測度	陰性予測度
LLNA-DA法 vs GPMT/BT法	11	87.5% (7/8)	100% (3/3)	90.9% (10/11)	100% (7/7)	75.0% (3/4)
LLNA-DA法 vs LLNA法	12	87.5% (7/8)	75.0% (3/4)	83.3% (10/12)	88% (7/8)	75.0% (3/4)
LLNA法 vs GPMT/BT法*	11	87.5% (7/8)	100% (3/3)	90.9% (10/11)	100% (7/7)	75.0% (3/4)

*：被験物質リスト中の判定での結果

3.9.2 EC3

SI 値の重み付き平均により求めた EC3 の値を表 3.9.5 に示す。

施設間再現性の低い物質 E と J について、重み付き平均を用いることは適切ではないかもしれない。E については用量反応関係が判定基準である 3 をまたいで V 字型となったために、カテゴリー分類のアルゴリズムが適用できず表 2.1 に示す判定ができなかった。この物質については、全ての濃度で SI 値の重み付き平均が 3 を超えているので、表 3.9.5 には Positive と表示した。

表 3.9.5 EC3 にもとづく感作性の判定

被験物質	LLNA-DA法		LLNA法
	EC3	感作性	感作性
A	0.056	Extreme	Extreme
B	11.059	Weak	Moderate
C	.	Negative	Moderate
D	0.34	Strong	Extreme
E	.	(Positive)	Strong
F	1.905	Moderate	Moderate
G	2.952	Moderate	Strong
H	.	Negative	Negative
I	.	Negative	Negative
J	2.682	Moderate	Negative
K	7.927	Moderate	Weak
L	.	Negative	Negative

*: SI 値の重み付き平均がすべての濃度で 3 を超えているが、用量反応関係が V 字型を示したために、EC3 の値を算出できない。

(この表は、物質が明らかになったときに LLNA の EC3 の値を追加する。)

4 議論

4.1 本研究の位置づけと意義

本研究の位置付け

OECD (2005) のガイドライン 34 の用語集には、Catch-up バリデーション研究とは“A validation study for a test method that is structurally and functionally similar to a previously validated and accepted reference test method. The candidate test method should incorporate the essential test method components included in performance standards developed for the reference test method, and should have comparable performance when evaluated using the reference chemicals provided in the performance standards”であると記載されている。

LLNA-DA 法は LLNA 法におけるエンドポイントの改良法であり、両試験法の原理は同じである。そして、本研究に用いた被験物質は、LLNA 法の性能を評価するために実施された被験物質を用いている。したがって、本バリデーション研究は、上記の Catch-up バリデーション研究に該当するといえるであろう。

12 被験物質により実施された LLNA-DA 法による判定と GMPT/BT 法の文献に記載された判定とを比較した結果は、同じ 12 物質で評価した LLNA 法の文献に記載された判定と GMPT/BT 法の文献に記載された判定とを比較した結果と同程度であった。また、LLNA-DA 法による判定結果を LLNA 法の文献値と比較した場合、高い一致度合いを示した。これらの結果より LLNA-DA 法は十分な代替可能性を持っているといえる。

本研究の特徴的な点

本バリデーション研究では、3 物質について 10 施設からなる実験施設の施設間再現性を評価した。LLNA 法に関しては、過去に複数の施設間再現性の評価結果が報告されている (Basketter ら (1991), Kimber ら (1991, 1995, 1998), Scholes ら (1992), Loveless ら (1996))。しかし、多くの報告で施設の規模は 5 施設程度であり、しかも必ずしも実験操作手順は同一ではない。

本研究は 3 物質について 10 施設が同一プロトコールで実験を実施している。このような規模での施設間再現性の評価は過去の LLNA 法の研究では行われていない。

施設間差を少なくするために、本研究では、技術研修会を実施し、陽性対照物質を用いた予備実験を行い、データシートを作成してデータの入力フォーマットの統一を行った。これらの配慮は結果に反映されていると思われる。被験

物質は遮蔽されていたにもかかわらず、10施設という規模で実施された3つの被験物質および陽性対照物質は良好な施設間再現性を示した。

4.2 本研究で評価した LLNA-DA 法の操作上的特徴

本研究で評価した試験法である LLNA-DA 法は、感作性の評価に関する原理は LLNA 法と同じである。LLNA-DA 法の特徴は、エンドポイントを ATP 発光量の測定としていることである。ATP 発光量の測定操作は極めて簡便であり、測定結果は迅速に得ることができる。一方、リンパ節中の ATP 量は動物の死亡後経時的に減少するため、測定操作は正確かつ迅速に行う必要がある。実験操作によるばらつきが大きくなるように、この研究で特に注意を促した点は以下の点であった。

- 細胞懸濁液の調製の際、潰した組織がスライドグラス上で乾燥すると十分な掻き取りができないので、PBS で濡らしながら丁寧に、かつ迅速に操作すること。
- 細胞懸濁液の調製の際、細胞懸濁液をできるだけ均一にすること。
- 動物の安楽死から ATP 発光量測定までを一定の時間内に終えること。そのため、安楽死させた動物の処置は途中で滞留することなく一連の操作で速やかに行うこと。
- ATP 発光量の測定の際、発光量は発光試薬添加後速やかに減少するため、発光試薬添加後すばやくに測定すること。

4.3 研究内の妥当性

4.3.1 被験物質の選択

本研究では、既知のデータが豊富で LLNA 法での実験結果がわかっている 20 の被験物質のリスト（資料 3）の中から 12 被験物質を選択した。

この報告書の作成時点で、最終的に被験物質選定担当者によって選定された 12 種類の被験物質は明らかにされていないが、LLNA 法による文献の EC3 値に基づき感作性を 3 段階（無 (Negative)、弱 (Weak, Moderate)、強 (Strong, Extreme)) に分類した場合、12 被験物質の感作性の内訳は、無が 4 物質、弱が 4 物質、強が 4 物質である。

4.3.2 データの質に関して

実施可能性の面から、本研究では、完全な GLP (good laboratory practice) に対応した実験を実施することまではできなかった。しかしながら、データの質を担保するために以下に記載するような配慮をした。

実験についての記録用紙（別添 5）を作成した。記録用紙には実験担当者・実

験責任者のもとで、機器の校正・作動確認、使用液・試薬の使用について、動物への適用、実験時間が記録され、各施設に残されている。

実験を実施する前に、すべての施設で使用する ATP 発光量の測定機器の校正が実施され、問題がないことを確認した。

測定値がこの研究のために準備された一定の書式のデータシート（別添 6）に正しく記録されているかどうかを確認するために、データクリーニングが行われ、実験中にデータシートのプリントアウトに入力されたデータと入力されたファイルとの値の整合性が確認された。なお、このデータシートは入力規制機能を用いて、不適切な値が入らないように設計された。

なお、各施設から集められたデータシートの電子ファイルは、プログラムにより一括して読み込まれ、データベースが作成されている。

4.3.3 施設内再現性

限定された結果であるが、陽性対照物質である HCA-25%AOO 溶液に関しては各施設で 2 ないし 3 回の繰り返しがある。この結果、すべての施設のすべての実験結果で SI 値は 3 を超えていた。

本研究で用いたばらつきの指標 $\exp(\tau^2)$ で実験間の再現性を評価した場合、その値は施設によって 1.00 から 1.05 の範囲であった（表 3.7.2）。最大値である 1.05 は、同じ指標を用いて施設間差を評価した場合に比べると大きくはないことがわかる（表 3.7.6）。

これらの結果から、陽性対照物質での施設内再現性は高いといえる。

4.3.4 施設間再現性

12 物質中 10 施設で実験を行った 3 物質（物質 A, B, I）は、用量反応関係、SI 値に基づく感作性の判定、各濃度の SI 値に関して高い施設間再現性を示した。

3 施設で実験を行った残り 9 物質中、5 物質（物質 C, F, H, K, L）も用量反応関係、SI 値に基づく感作性の判定、各濃度の SI 値に関して高い施設間再現性を示した。

2 物質（物質 D, G）は、SI 値に基づく感作性の判定では施設間差が生じたが、用量反応関係、各濃度の SI 値に関しては高い施設間再現性であった。つまり、これらの 2 物質の高濃度での SI 値は判定の基準値である 3 前後であり、実験による変動が影響したと考えられる。本研究では濃度は固定されているので高濃度以上での実験は実施されていないが、現実にある特定の物質を評価する場合には用量反応がみられ高濃度で SI 値が 3 よりもわずかに小さな値であれば、さらに高い濃度での実験が実施されるであろう。

2 物質（物質 E と J）では、施設間の SI 値は大きなかい離が生じた。12 被験

物質中で、これら 2 物質のみが溶媒は AOO ではなかった。つまり、溶媒の影響の可能性が否定できない。さらに両物質とも析出していたり、沈殿していたり、結晶が生じていたため、これら 2 物質を実験した施設では、それぞれの対処を行った。すなわち、これら 2 物質は塗布が困難であった可能性も否定できない。いずれにしても、これら 2 物質が何であったのかが明らかになったときに、文献で記載されている LLNA 法の結果との吟味が必要となるであろう。

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

対象となる試験法である GPMT/BT 法、LLNA 法の感作性の判定結果は、Haneke ら (2001) と Gerberick ら (2004) の文献の値を用いた。

4.3.6 対象となる試験法のデータとの対応性

対象となる試験法との対応性として、GPMT/BT 法を基準とした LLNA-DA 法の感度は 87.5% (7/8)、特異度は 100% (3/3)、一致割合は 90.9% (10/11) であった。この結果は、本研究で用いた同じ物質に 12 被験物質について、被験物質の候補リスト (資料 3) に記載された文献値上で GPMT/BT 法を LLNA 法と比べた結果と同じ結果であった。つまり、この研究で用いた被験物質における結果に関して、LLNA-DA 法は LLNA 法と同等な性能を持つといえる。

また、LLNA 法を基準とした LLNA-DA 法の対応性は、感度 87.5% (7/8)、特異度 75.0% (3/4)、一致割合 83.3% (10/12) であった。つまり、LLNA 法の判定で陽性のものを LLNA-DA 法で陰性と判定した物質が 1 物質あり、一方で LLNA 法で陰性と判定された物質で LLNA-DA 法で陽性と判定された物質が 1 物質あった。このかい離についての考察は、被験物質が明らかになった段階で行う必要がある。

4.4 研究外の妥当性

4.4.1 試験法の頑健性

本研究では、可能な限り条件をそろえて施設間の再現性評価を試みた。このため動物種や ATP 発光量の測定器の違いを含めて SOP (資料 5) からのかい離の程度がどの程度結果に影響するのかは明確ではない。

4.4.2 動物福祉面について

動物の福祉に関する側面に関して、LLNA-DA 法は LLNA 法と基本的には変わりはない。すなわち、この試験系はマウスを使った *in vivo* の試験法であり動物を使用しない方法ではない。しかしながら、皮膚感作性評価に関して、従来より実施されてきたモルモットの試験と比べて、これらの方法には要求されて

いる動物の使用数を減少できるという点では利点がある。また、LLNA-DA 法は7日目に塗布操作が入るため実験に要する日数は8日と LLNA 法と比べて2、3日が長くなるものの、これらの方法は感作誘導反応を評価しているため、感作誘発期の評価を行う GPMT 法（24日程度）や BT 法（38日程度）に比べて、実験に要する日数が短いという利点がある。また、GPMT 法ではモルモットの感受性を高めるために Adjuvant を用いるが、これは動物に対する負担が大きい。一方、LLNA-DA 法や LLNA 法では FCA を用いないので、Refinement の観点から優れているといえるであろう。

4.4.3 コストについて

LLNA 法は RI 施設で実施する必要があるが、³H で標識されたチミジンの DNA への取り込み量を測定するためにシンチレーションカウンターが必要である。これに対して、LLNA-DA 法は RI 施設で実施する必要がなく、ATP 発光量の測定器はシンチレーションカウンターに比べて相対的に安価である。

また、試薬の観点でも、LLNA-DA 法で用いる ATP 発光量の測定キットは LLNA 法で用いる ³H で標識されたチミジンとを比較するとコストは約 1/2 程度に抑えることができる。

4.5 評価委員による評価結果への返答としてのまとめ

本研究を実施する前に、日本動物実験代替法学会評価委員会より、以下の助言を受けた。1)中心となる施設に提案施設はダイセル化学工業（株）が努め、SOP を作成し、技術移転を実施する。2)実験実施施設には ATP 発光量の測定器を有することが望ましい。3)実験施設は 1 施設あたり最大 6 被験物質程度が実施可能であろう。4)1 群あたりの動物数は 4 匹がよい。5)濃度設定は公比 10 の 3 濃度で行うのがよい。6)被験物質の候補リストはダイセル化学工業（株）の協力を得て作成する。7)バイアスがなるべく少なくなるように、条件をそろえて実施するのが良い。

これらの助言に関して、本研究では 5)の公比 10 で濃度をということが守られてはいない。5)は施設で被験物質を希釈する際に施設によって公比が異なることがないように統一するという意味であると思われる。本研究では被験物質を配布する際に希釈して送付しているため、施設によって異なる濃度で被験物質を実験することはない。このときの濃度設定は、過去に提案施設のダイセル化学工業（株）にて実施された実験の SI 値に基づき設定された。

4.6 SOP に関して

本研究で用いた SOP（資料 5）は、当初の提案施設が作成した LLNA-DA 法

プロトコール（資料 4）を基に，このバリデーション研究用に作成されたものである。本研究の SOP では，バリデーション研究用に設定された群の構成等に関する事項だけでなく，LLNA-DA 法の操作で重要な点である「細胞懸濁液の調製の実験手順」及び「ATP 量の測定」に関しても補遺として加筆した。提案施設の作成した LLNA-DA 法プロトコールを今後改訂する際には，本研究で使用された SOP の内容を反映させるべきであろう。

4.7 本研究の限界と今後の課題

本研究にもいくつかの限界がある。以下にこのことについて記載する。

- ・被験物質数について

本研究の結果，LLNA-DA 法は良好な施設間再現性と代替可能性を示した。しかしながら，本研究で評価に用いた被験物質数はわずか 12 物質のみである。特に代替可能性の検討では，1 物質の結果の評価の違いが，感度などの指標に大きく影響してしまう。被験物質 E と J の施設間再現性が悪かった理由として他の物質と異なり溶媒を他の物質で用いるような実験や，E 及び J に類似するような物性をもつ物質について実験を行って確かめる必要があるかもしれない。

全般的に施設間再現性は良好な結果であったので，今後は，提案施設を中心に，より多くの物質での実験を行った結果が必要である。

- ・実験施設

本研究を遂行するにあたり，実験施設は LLNA 法もしくはその改良法の実施経験のある施設を選んだ。施設間再現性のよさが，実施経験の少ない施設で同じように示すことができるかどうかは，本報告が示す結果のみでは明確ではない。

- ・本研究特有の事項

本研究では，各被験物質はあらかじめ調製されて実験施設に送付された。このため被験物質の析出が認められた物質について各実験施設で改めて調製を行うことはできなかった。しかし，通常の実験では，析出等が認められた場合に再度被験物質の調製が実施されるであろう。本研究ではこの点が結果に与える影響について把握できない。

5. 結論

統一された SOP に基づき，LLNA 法や GPMT/BT 法で結果が知られている 12 物質を用いて多施設バリデーション研究を実施した結果，LLNA-DA 法は施設間差が小さく，GPMT/BT 法に対する代替可能性は LLNA 法と同等である試験法であることが確認された。

謝辞

本研究は厚生労働科学研究「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」班，日本動物実験代替法学会の協力を得ました。本研究に対する理解と支援に感謝いたします。

本研究は，多くの方の協力を得ました。彼らの協力なしでは本研究を行うことができませんでした。以下の方々に心より感謝いたします。

上森健至（ダイセル化学工業株式会社），山岸学（ダイセル化学工業株式会社），山下邦彦（ダイセル化学工業株式会社），小濱とも子（国立医薬品食品衛生研究所），古谷真美（財団法人食品薬品安全センター），森村智美（財団法人食品薬品安全センター），志田勝彦（財団法人食品薬品安全センター），白石啓二（財団法人化物質評価研究機構），飯田憲二（財団法人化物質評価研究機構），東原信彦（財団法人化物質評価研究機構），森本隆史（住友化学株式会社），正門孝臣（住友化学株式会社），檜垣環（住友化学株式会社），後藤浩彦（大塚製薬株式会社），白石明（明示製菓株式会社），織原由佳里（大正製薬株式会社），山崎紀世（大正製薬株式会社），小宮千春（富士フイルム株式会社），吉野幸江（富士フイルム株式会社），藤島敦（財団法人食品農医薬品安全性評価センター），竹原広（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）

参考文献

- Basketter, D. A., Scholes, E. W., Kimber, I., Botham, P. A., Hilton, J., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C. and Waite, S. J. (1991) Interlaboratory evaluation of the local lymph node assay with 25 chemicals and comparison with guinea pig test data. *Toxicology Methods* 1, 30-43.
- Basketter, D. A. and Sholes, E. W. (1992) Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. *Food and Chemical Toxicology* 30, 65-69.
- Basketter, D. A., Gerberick, G. F. and Kimber, I. (1998) Strategies for identifying false positive responses in predictive skin sensitization tests. *Food and Chemical Toxicology* 36, 327-333.
- Basketter, D. A., Lea, L. J., Cooper, K. J., Ryan, C. A., Gerberick, G. F., Dearman, R. J. and Kimber, I. (1999) Identification of metal allergens in the local lymph node assay. *American Journal of Contact Dermatitis* 10, 207-212.
- Basketter, D. A., Gerberick, G. F. (1996) The local lymph node assay: a viable alternative to currently accepted skin sensitization tests. *Food and Chemical Toxicology* 34, 985-997.
- Basketter, D. A., Lea, L. J., Dickens, A., Briggs, D. Pate, I. Dearman R. J. and Kimber I. (1999) A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. *Journal of Applied Toxicology* 19, 261-266.
- Basketter, D. A., Blaikie, L., Dearman, R. J., Kimber, I., Ryan, C. A., Gerberick, G. F., Harvey P., Evans, P., White, I. R. and Rycroft, J. G. (2000) Use of the Local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* 42, 344-348.
- Basketter, D. A., Evans, P., Fielder, R. J., Gerberick, G. F., Gearman, R. J. and Kimber, I. (2002) Local lymph node assay – validation, conduct and use in practice. *Food and Chemical Toxicology* 40, 593-598.
- Basketter, D. A., Casati, S., Gerberick, G. F., Griem P., Philips B and Worth A. (2005) Skin sensitisation. *Alternatives To Laboratory Animals* 33 supplement 1, 83-103.
- Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Gattan, D. G. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node

- assay. II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 34, 258-273.
- Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kimber, I., Dearman, R. J. and Basketter D. A. (2000) Local lymph node assay: Validation assessment for regulatory purposes. *Toxicology* 11, 3-18.
- Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kern, P. S., Dearman, R. J., Kimber, I., Patlewicz, Y. and Basketter, D. A. (2004) A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis* 50, 274-288.
- Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H. and Stokes, W. S. (2001) 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. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 34, 274-286.
- Kimber, I., Hilton, J., Botham, P. A., Basketter, D. A., Scholes, E. W., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C., Gray, T. J. B. and Waite, S. J. (1991) The murine local lymph node assay: results of an inter-laboratory trial. *Toxicology Letters* 55, 203-213.
- Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Scholes, E. W., Ladics, G. S., Loveless, S. E., House, R. V. and Guy A. (1995) An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. *Toxicology* 103, 63-73.
- Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Lea, L., House, R. V., Ladics, G. S., Loveless, S. E. and Hastings K. (1998) Assessment of the skin sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: an interlaboratory evaluation. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 53, 563-579.
- Loveless, S. E., Ladics, G. S., Gerberick G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Scholes, E. W., House, R. V., Hilton, J., Dearman, R. J. and Kimber, I. (1996) Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial. *Toxicology* 108, 141-152.
- Normand, S. L. T. (1999) Meta-analysis: formulating, evaluating, combining, and reporting. *Statistics in Medicine* 18, 321-359.
- OECD (1992) Organization for Economic Co-operation and Development – OECD guidelines for testing of chemicals. No. 406: Skin sensitization.

- OECD (2002) Organization for Economic Co-operation and Development – OECD guidelines for testing of chemicals. No. 429: Skin sensitization: Local lymph node assay.
- OECD (2005) Organization for Economic Co-operation and Development – OECD series on testing and assessment. No. 34: Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment.
- Sailstad, D. M., Hattan, D., Hill, R. N. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. I. ICCVAM review process. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 34, 249-257.
- Scholes, E. W., Basketter, D. A., Sarll, A. E., Kimber, I., Evans, C. D., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C. and Waite, S. J. (1992) The local lymph node assay: Results of a final inter-laboratory validation under field conditions. *Journal of Applied Toxicology* 12, 217-222.
- Yamashita K., Idehara K., Fukuda N., Yamagishi G. and Kawada N. (2005) Development of a modified local lymph node assay using ATP measurement as an endpoint. *Alternatives to Animal Testing and EXperimentation* 11, 136-144.

皮膚感作性試験代替法 (LLNA-BrdU 法) バリデーション研究計画書 Version 1.0

2006年7月3日 作成者 小島 肇

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-BrdU 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課題について、多施設の実験を通して評価を行うことである。

2. 実行組織

本組織の正式名称を「LLNA-BrdU 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-BrdU 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-BrdU法バリ実行委名簿」に記しておく。任命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1内に記しておく。

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-BrdU 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：被験物質候補（資料2）より研究に用いる被験物質を選定する。

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。

動物手配担当者：実験用動物の注文・配布の手配を行う。

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、試料等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。

3. LLNA-BrdU 法の実験手順

実験担当者は、資料3「LLNA-BrdU法プロトコール」にもとづいて本実行委が作成した資料4「LLNA-BrdU法バリ研究実験SOP」に従って、本実行委が用意あるいは指定した試料・資材を用いて、LLNA-BrdU 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7月3日に、第1回実行委員会を開催して実験参加施設を確定し、委員と研究計画書を決定し、本実行委を発足させ、以後の研究遂行を本実行委に委任する。本実行委は2006年7月中旬に、別に述べる日程で技術研修を実施する。

実験担当者は2006年8月18日までに各施設で予備実験を行い、本研究計画書及び、LLNA-BrdU 法実験SOPの改訂についての意見を実行委員長に提出する。本実行委はこれらの意見に基づいて、8月22日の第2回実行委員会で、本研究計画書とLLNA-BrdU 法実験SOPの改訂を行う。

被験物質割付担当者は2006年8月31日までに被験物質の割付を行い、結果を試料等手配担当者に報告する。試料等手配担当者は被験物質割付の結果に従い被験物質をコード化した後、実験実施日程に合わせて資材とともに被験物質を実験参加施設に送付する。

実験担当者は2006年10月より実験を開始し、2007年1月10日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2007年1月に中間報告会を開催する。

本実行委は2007年2月末までに報告書をまとめる。

本実行委は2007年3月にLLNA-BrdU 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（参加施設代表者）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。

実験参加施設は参加施設代表者もしくは実験担当者の中から実験について責任を負う実験責任者をおく。

6. 被験物質

被験物質選定担当者は、資料2「被験物質候補のリスト」から、既知データに基づいて、皮膚感作性の程度のバランスを考慮して被験物質を選定し、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の実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

被験物質割付担当者は、表1に概念的に示すように、被験物質選定担当者により選択された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、その他の被験物質については、バランスを考慮して一部の施設に割り付ける。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。

動物手配担当者は、各実験施設と打ち合わせを行い、動物送付の手配を行う。

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7月11, 12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、8月22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、第2回実行委員会での検討結果に基づいて、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、実験遂行中に計画変更の必要が生じた場合、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
- (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) BrdU取り込み量(吸光度)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。

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、国立医薬品食品衛生研究所（現時点では、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、研究終了後5年が過ぎるまで保管する。

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) 標準被験物質と陽性対照物質のSI値及び指定したSI値を与える濃度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。

13. 中間報告会