

2) 皮膚感作性試験代替法 LLNA-BrdU 法のバリデーション

研究要旨

皮膚感作性試験Local Lymph Node Assay (LLNA) の放射性同位元素 (RI) 標識化合物を用いない代替法 (LLNA-BrdU法) の多施設バリデーションを日本動物実験代替法学会に依頼し、学会バリデーション委員会の下部組織としてバリデーション実行委員会を組織して実施された。このバリデーション研究の結果、12 の被験物質の濃度範囲で得られた結果から、LLNA-BrdU法はLLNA法と比較してバラツキが大きく、試験法の改良が必要であると結論された。

A. 研究目的

local lymph node assay (LLNA 法) はマウスのリンパ節細胞増殖反応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-BrdU法は³H-thymidine の取り込み量の代わりにBrdU量を指標として判定する方法であり、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、LLNA-BrdU 法の施設間再現性と代替可能性の検討を主目的とし、LLNA法バリデーション研究を参考に、多施設キャッチアップバリデーション研究を実施した。

B. 研究方法

本研究はLLNA-BrdU法の実験プロトコールに基づいて実施した。陽性対照物質 (50% hexyl cinnamic aldehyde : HCA) 以外の12の被験物質のうち、3 物質は全9施設で、残りの9 物質は3 施設毎に評価した。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。溶媒対照群のBrdUと取り込み量対する被験物質群のBrdU取り込み量の比 (stimulation index, SI値) が2 を超えた場合、陽性と判定した。

C. 結果と考察

全施設で評価した陽性対照物質HCAのSI値はバラツキが大きく、実験に用いたすべての被験物質の結果は評価できないと判断された。よって、実行委員会における検討の結果、プロトコールの改良が必要であると考察された。

D. 結論

本研究で実施した得られた結果から、LLNA-BrdU法はLLNA法と比較してバラツキが大きく、試験法の改良が必要である、それを受けて、第2次バリデーション研究が必要と結論された。

E. 資料

- 資料 2-1 LLNA-BrdU1 次報告書
- 資料 2-2 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
- 資料 2-3 LLNA-BrdU 法バリデーション実行委員名簿
- 資料 2-4 実験担当者一覧
- 資料 2-5 被験物質の候補リスト
- 資料 2-6 LLNA-BrdU 法実験プロトコール
- 資料 2-7 LLNA-BrdU 法実験実施日程
- 資料 2-8 データシートの例
- 資料 2-9 データシートの入力の手引き
- 資料 2-10 SI 値とその 95%信頼区間
- 資料 2-11 SI 値を用いた施設間再現性の指標の算出法

LLNA-BrdU 法バリデーション研究 (第1実験)

報告書

報告書作成日：2007 年12月24 日

報告書作成責任者：小島 肇

LLNA-BrdU 法バリデーション研究実行委員

委員長

小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部)

委員

大森 崇 (京都大学大学院医学研究科医療統計学分野)

寒水孝司 (大阪大学臨床医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)

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)

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)

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

ACD: Allergic Contact Dermatitis

A00 :Acetone/Olive Oil

BrdU: BromodeoxiUridine

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 Validity 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

SOP: Standard Operating Procedure

目次

はじめに.....	5
要約.....	5
1. 背景.....	6
1.1 皮膚感作性.....	6
1.2 モルモットを用いた試験法.....	6
1.3 LLNA 法.....	6
1.4 LLNA-BrdU 法.....	6
1.5 本研究にいたるまでの過程.....	6
1.6 本研究の目的.....	7
2. 方法.....	7
2.1 組織と役割.....	7
2.1.1 研究の組織	
2.1.2 各組織の役割	
2.2 LLNA-BrdU の操作法.....	8
2.3 操作法の普及.....	9
2.3.1 技術研修会	
2.3.1 予備試験	
2.4 被験物質.....	9
2.4.1 割付	
2.4.2 試料等の配布	
2.5 実験実施のスケジュール.....	11
2.6 データの管理.....	12
2.7 データベース.....	12
2.8 データ解析の方法.....	12
2.8.1 体重, リンパ節重量, ATP 発光量	
2.8.2 SI 値とその95%信頼区間の算出	
2.8.3 施設内再現性, 施設間再現性を評価する方法	
2.8.4 代替可能性の検討の方法	
2.8.5 EC3 の算出方法と刺激のカテゴリー	
2.8.6 ソフトウエア	
3. 結果.....	13
3.1 研究の質について.....	13
3.2 選択された被験物質と割付け結果.....	13
3.3 データの取り扱いについて.....	14
3.4 背景基礎データ.....	15
3.4.1 体重	
3.4.2 BrdU取り込み (吸光度)	
3.4.3 リンパ節重量とBrdU取り込み量の関係	
3.5 LLNA-BrdU の分析感度.....	17

3.6 各被験物質の用量反応関係.....	18
3.7 施設間の再現性.....	19
3.8 施設内の再現性.....	19
3.9 代替可能性.....	20
4. 考察.....	19
4.1 本研究の位置付け.....	19
4.2 本研究の妥当性.....	20
4.2.1 本研究で評価したLLNA-BrdU 法の特徴	
4.2.2 被験物質の選択	
4.2.3 試験法の普及	
4.2.4 データの質に関して	
4.2.5 個々の被験物質に対する考察	
4.3 本研究の限界と今後の課題.....	21
5. 結論.....	22
謝辞.....	22
参考文献.....	22

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-BrdU 法バリデーション研究実行委員会(以後、LLNA-BrdUバリ実行委と記す)が実施したバリデーション研究報告書である。

要約

【目的】 local lymph node assay (LLNA 法) はマウスのリンパ節細胞増殖反応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-BrdU 法は³H-thymidine の取り込み量の代わりにBrdU量を指標として判定する方法であり、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、LLNA-BrdU 法の施設間再現性と代替可能性の検討を主目的とし、LLNA法バリデーションを参考に、多施設キャッチアップバリデーション研究を実施した。

【方法】 本研究はLLNA-BrdU法の実験プロトコールに基づいて実施した。陽性対照物質(50% hexyl cinnamic aldehyde : HCA)以外の12の被験物質のうち、3物質は全9施設で、残りの9物質は3施設毎に評価した。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。溶媒対照群のBrdUと取り込み量対する被験物質群のBrdU取り込み量の比(stimulation index, SI値)が2を超えた場合、陽性と判定した。

【結果と考察】 全施設で評価した陽性対照物質HCAのSI値はバラツキが大きく、実験に用いたすべての被験物質の結果は評価できないと判断された。よって、実行委員会における検討の結果、試験手順書の改良が必要であると考察された。

【結論】 本研究で実施した得られた結果から、LLNA-BrdU法はLLNA法と比較してバラツキが大きく、試験法の改良が必要であると結論された。

1. 背景および目的

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現象をいう。ACD は医薬品、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。

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としては、長い間モルモットを用いた試験であるGuinea-pig maximization test 法 (GPMT 法) やBuehler test 法 (BT 法) が利用されてきた (OECD, 1992)。これらの試験法では、感作誘導を行い、一定期間後の惹起処置による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により感作誘導を行うが、BT 法ではFCA を用いず、皮膚への繰り返し塗布により感作誘導を行う点がこれらの相違点である。

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 (Basketter and Scholes, 1992, Basketter ら, 2002, Haneke ら, 2001)) 。

また、この方法はOrganization for Economic Cooperation and Development (OECD) 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) , Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) 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) 。

しかし、LLNA 法は感作誘導期のリンパ節細胞増殖反応を³H で標識されたチミジン (³H-thymidine) のDNA への取り込みを指標として皮膚感作性を評価する。我が国ではRI (Radioactive Isotope) の取り扱い規制が厳しく、LLNA法の普及は十分ではない。

1.4 LLNA-BrdU法

化学物質評価機構 (以後、化評研) は、リンパ細胞増殖を検出する指標として³H-thymidineの代わりにBrdU (BromodeoxyUridine) 取り込み量に改良したLLNA-BrdU 法を開発した (Takeyoshiら, 20001) 。

1.5 本研究にいたるまでの過程

化評研は、動物実験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-BrdU 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、かつ時間のかからず、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-BrdU 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がLLNA-BrdU 法バリデーション研究実行委員会（以下、LLNA-BrdU バリ実行委）を組織させ、この実行委員会が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

本研究の研究計画には、以下の目的を含むLLNA-BrdU法研究計画書（資料1）に従い実施された。

本研究の目的は、LLNA-BrdU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-BrdU 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めた。

2. 方法

2.1 組織と役割

2.1.1 研究の組織

本研究を遂行するための研究組織、LLNA-BrdU法バリデーション研究実行委員会（以下、LLNA-BrdU 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募集したバリデーション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) 各実験実施施設の代表者として必要な委員

各実験実施施設から数名。

当初、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会がLLNA-DA法バリデーション研究の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。このうち、施設の都合により9施設の代表者がLLNA-BrdU バリ実行委として本研究に参加した。

LLNA-BrdUバリ実行委を資料2「LLNA-BrdUバリ実行委」に、実験参加施設とその実験担当者を資料3「実験担当者一覧」に示す。

2.1.2 各組織の役割

LLNA-BrdUバリ実行委の中に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-BrdU法の内容，standard operating procedure (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4「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。

動物手配担当者：実験用動物の注文・搬入の手配を行う。

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-BrdUの操作法

資料1「LLNA-BrdU法研究計画」にもとづいて，この研究用にLLNA-BrdUバリ実行委がSOPを作成した。このSOPの最終版は資料5「LLNA-BrdU法実験SOP」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/JNCr1j 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溶媒対照，陽性対照（50% hexyl cinnamic aldehyde/A00溶液），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

溶媒：事前に被験物質候補リスト（資料4）に記載された溶媒を用いて，被験物質ごとに設定された濃度に調製後，遮蔽下で送付される。

測定指標：BrdU測定キットを用い，吸光度でBrdU取り込み量を測定

試験操作：図1に概略を示す。

- ① 両耳介に被験物質を3日間続けて塗布する。
- ② 最終感作の約48時間後に，BrdU 0.5 mLを1回腹腔内投与する。
- ③ BrdU投与の約24時間後に，リンパ節を採取する。
- ④ リンパ節をつぶし，緩衝液を15mL加えて均一な細胞懸濁液を作製し，BrdU測定キットを用い，マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定する。この値が0.2を超える場合には細胞懸濁液の冷蔵保存液を翌日以降希釈して，再測定に用いることができる。

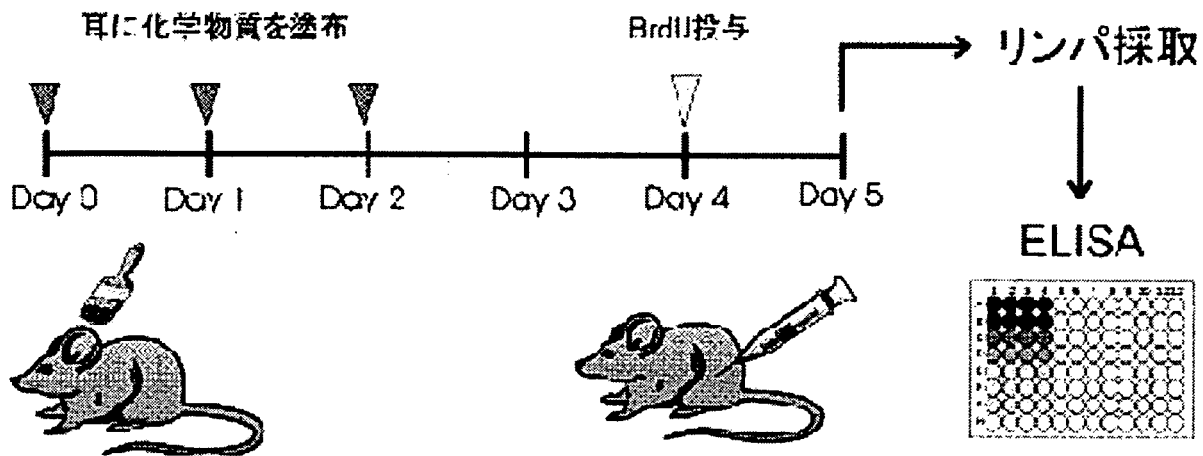


図1. LLNA-BrdU操作法

結果の評価：各個体の BrdU 測定値（吸光度）の平均値を算出した後、陰性対照群の平均値を算出する。

各個体の BrdU 測定値の平均値を陰性対照群の平均値で除した数値 (Stimulation Index, SI) を算出した後、各用量群の平均 SI 値およびその標準偏差および標準誤差を算出し、被験物質投与群の SI 値の平均値が 2 を超える場合を陽性と判定する。

1 回に実施する被験物質数：1 回の操作で 2 被験物質および陽性対照物質を実施する。（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 操作法の普及

2.3.1 技術研修会

各実験施設の実験担当者が LLNA-BrdU 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。

2006 年 7 月 11 および 12 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（図 2-1 および 2-2）。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法の実習が行われた。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。さらに、確認用の映像資料も配布された。

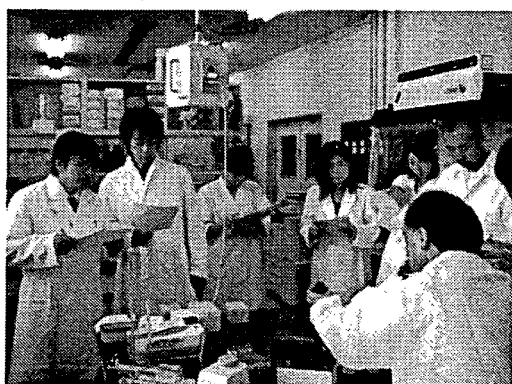


図2-1 実験風景



図2-2 会議風景

2.3.2 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、7月3日の第一回実行委員会において、

資料5「LLNA-BrdU 法SOP」に従い陽性対照物質のみを用いた予備実験の実施を決定した。LLNA-BrdUバリ 実行委は、本研究計画書および、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した。本実行委は予備試験結果と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を改訂した。得られた結果から、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 の大きな変更はしなかった。

2.4 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した。被験物質の候補リストを資料4「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 被験物質を選択した。これらの物質は先立って行われたLLNA-DAバリデーションと同一の物質とした。選択された被験物質は、LLNA の結果を参考に3 濃度が設定された。これらの被験物質は各濃度に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。送付された被験物質およびコード記号一覧を表2として示す。

2.4.1 割付

使用する動物数を少なくするため、1 回の実験で、溶媒が同じ2 つの被験物質群（1 施設の1 実験のみ3 被験物質群）と共通の1 つの溶媒の群を構成した。

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。

2.4.2 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。動物手配担当者は、各実験施設と打ち合わせを行い、動物搬入を手配した。配布された被験物質のリストを表2に示す。

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			○	○
...				...

表2. LLNA-BrdU法バリデーション研究物質リスト

コード	No.	Chemical name	溶媒	分類	Classification ※	適用濃度 (%)		
						10	25	50
D	1	Isopropanol (2-Propanol)	A00	共通	Negative	10	25	50
I	2	Hexylcinnamic aldehyde (Hexylcinnamal. α -Hexylcinnamaldehyde)	A00	共通	Moderate	10	25	50
K	3	2,4-Dinitrochlorobenzene (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene)	A00	共通	Extreme	0.1	0.3	1
E	4	Nickel sulfate (Nickel(II) sulfate hexahydrate)	DMSO		False Negative	1	3	10
F	5	Dimethyl isophthalate	A00		Negative	10	25	50
A	6	Methyl salicylate	A00		Negative	10	25	50
H	7	Abietic acid	A00		Weak	10	25	50
J	8	3-Aminophenol	A00		Moderate	1	3	10
C	9	Isoeugenol (mixture of cis and trans)	A00		Moderate	1	3	10
L	10	Glutaraldehyde solution (ab. 25%)	ACE		Extreme	0.1	0.3	1
B	11	Formaldehyde solution (36~38%)	ACE		Strong	1	3	10
G	12	Cobalt chloride	DMSO		Strong	0.3	1	3

2.5 実験実施のスケジュール

平成18年8月~12月にかけて各施設が実験スケジュールを立て、実験を行った(資料6)。

2.6 データの管理

2.6.1 記録用紙

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(資料7「LLNA-BrdUバリデーション研究記録用紙」)に記録した。

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

2.6.2 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（資料8「データシート」）を作成した。各実験施設には被験物質のコードが記載されたデータシートのファイルが送付され、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。

2.6.3 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となるデータが入力されていないか、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。

2.6.4 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。

2.6.5 データ解析の方法

1) 体重、リンパ節重量、BrdU取り込み量

体重（1日目と6日目）、リンパ節重量、BrdU取り込み量は基本統計量（平均、標準偏差など）を算出した。BrdU取り込み量は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) 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吸光度および溶媒の吸光度の比で算出されるSI 値に基づき実施した。SI 値は、個々の実験の用量毎にひとつの値が得られる。SI 値の近似的な95%信頼区間は、資料9「SI 値とその95%信頼区間の計算法」に示す方法により得た。

3) 施設内再現性、施設間再現性の評価

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した。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 $\exp(t2)$ と表記することにした。 $\exp(t2)$ 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))。 $\exp(t2)$ 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資料10「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行った。施設内再現性の評価の指標も $\exp(t2)$ を用いた。

4) 代替可能性の検討

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2を超えた場合に陽性、そうでない場合に陰性と判定し上記の代替可能性の指標を求めた。

5) EC3 の算出方法

上記の方法で得た各濃度のSI 値の重み付き平均が2 となる濃度の予測値をEC2 として算出した。算出方法は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2 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2 を上回る場合には、2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EC2 に基づき、感作性のカテゴリーを決め（Gerberick ら（2004））、このカテゴリーでLLNA 法とLLNA-BrdU法を比べた。

2.6.6 ソフトウエア

以上の解析は、SAS version 9 を用いて行った。

3. 結果

3.1 選択された被験物質と割付け結果

表3に各施設への被験物質の割付け結果を示す。基本的には1 施設あたり6被験物質を実施したが、No. 9 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8 被験物質分の実験を実施した。

表3. 被験物質の割付けと実験順序の一覧

施設 割付け番号	第1期		第2期			第3期		
	4群～6群	7群～9群	4群～6群	7群～9群	(10群～12群)	4群～6群	7群～9群	(10群～12群)
5	11 (B)	10 (L)	8 (J)	2 (I)	6 (A)	9 (C)	3 (K)	1 (D)
8	8 (J)	5 (F)	1 (D)	2 (I)	-	3 (K)	6 (A)	-
6	2 (I)	1 (D)	3 (K)	9 (C)	-	10 (L)	11 (B)	-
7	7 (H)	5 (F)	3 (K)	6 (A)	-	2 (I)	1 (D)	-
4	10 (L)	11 (B)	3 (K)	7 (H)	-	2 (I)	1 (D)	-
3	1 (D)	2 (I)	4 (E)	12 (G)	-	9 (C)	3 (K)	-
1	3 (K)	7 (H)	1 (D)	2 (I)	-	4 (E)	12 (G)	-
2	4 (E)	12 (G)	3 (K)	8 (J)	-	2 (I)	1 (D)	-
9	1 (D)	2 (I)	3 (K)	5 (F)	-	-	-	-

3.2 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

すべての記録用紙を確認し、不備については後日問い合わせ確認した。

- ・ データクリーニング

実験担当者は、実験中に測定した吸光度などを、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を行ない、最終的な値を決めた。

- ・技術移転および予備試験の実施
- ・計画書、SOP の改訂経過の記録

3.3 データの取り扱いについて

1) 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・沈殿の有無が異なることが判明した。表4に被験物質の状態観察記録の報告のあった物質のみをまとめた。

表4. LLNA-BrdU バリデーション 被験物質溶液の取り扱い

記号	物質名	施設	被験物質配布者の調製時の状態	問題点	処理事項
B	Folmaldehyde	5	溶解	-	
		6		乾きにくい	
		4		高濃度で析出あり	
E	Nickel Sulfate	3	70℃加熱および超音波懸濁	懸濁	超音波処理
		1		懸濁	ボルテック攪拌または超音波処理後、温水で溶解
		2		?	
F	Dimethyl salicylate	8	溶解	懸濁液がチップに詰まる	
		9		高濃度固化	温浴で溶解
		7			
H	Abietic acid	7	高濃度では超音波にて懸濁	高濃度懸濁	
		4			
		1		懸濁	ボルテック攪拌
J	3-Aminophenol	5	溶解		
		8			
		2		析出あり	

その他被験物質で調製法に配慮したもの：G 超音波溶解

3.4 背景基礎データ

3.4.1 体重

実験開始1日目、6日目の動物の体重の基本統計量をそれぞれ表5、表6に示す。施設によっては1日目に比べ6日目の体重が減っている施設もあったら、全体として施設間の大きな変動はみられなかった。

表 5. 1日目の体重の基本統計量

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	132	22.3	1.14	19.7	21.50	22.10	23.00	25.1
2	108	22.6	1.53	19.1	21.50	22.40	23.80	26.1
3	108	22.5	1.26	19.7	21.50	22.40	23.45	25.3
4	108	22.5	1.36	20.3	21.45	22.30	23.35	27.1
5	105	22.0	1.37	18.9	20.80	22.10	22.90	25.6
6	108	22.4	1.30	19.3	21.50	22.55	23.30	25.7
7	108	22.6	1.41	19.5	21.55	22.50	23.50	26.1
8	108	23.3	1.56	20.0	22.00	23.25	24.25	28.3
9	72	22.7	1.26	19.2	21.75	22.75	23.55	25.6

表 6. 6日目の体重の基本統計量

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	132	23.1	1.26	20.8	22.20	22.90	23.90	26.5
2	108	22.4	1.50	18.5	21.40	22.05	23.30	26.1
3	108	22.8	1.42	19.9	21.85	22.80	23.60	26.7
4	108	23.3	1.48	20.4	22.30	23.10	24.05	27.9
5	105	21.9	1.43	19.1	20.80	21.90	22.80	25.4
6	108	22.7	1.29	18.9	21.85	22.85	23.60	25.4
7	108	22.8	1.53	19.7	21.70	22.60	23.90	26.6
8	108	23.3	1.55	20.6	22.10	23.25	24.45	27.5
9	72	23.3	1.36	20.3	22.45	23.10	24.20	26.8

3.4.2 BrdU取り込み量 (吸光度)

表7に各物質の溶媒および用量毎の吸光度の平均と標準偏差を示す。溶媒の吸光度が施設毎で大きく異なった。図3に示すように、陽性対照の吸光度も大きな差を示した。施設間で比較した結果、その値は10倍程度異なった。この理由として、施設毎の希釈方法の違いが挙げられる。これについては考察に詳細を記す。

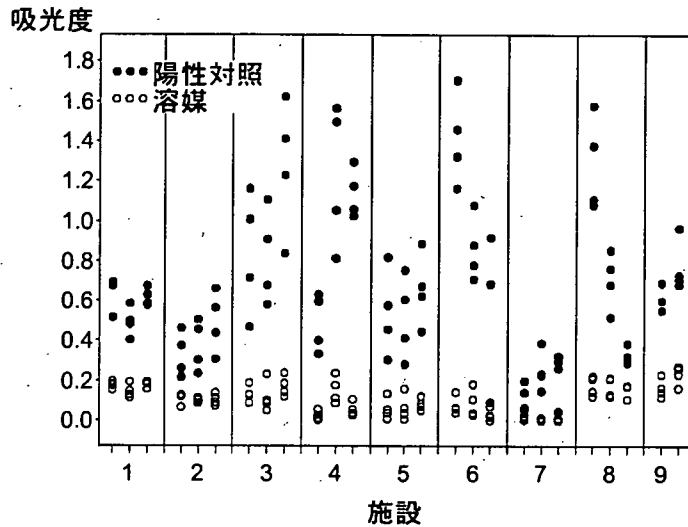
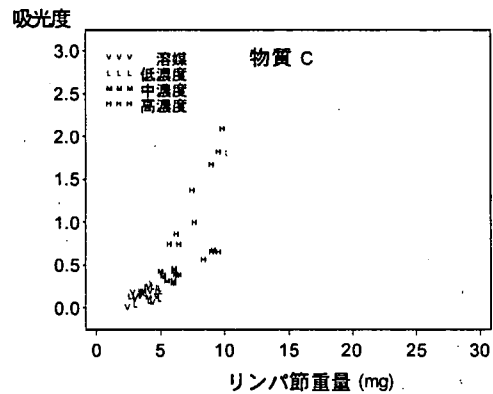
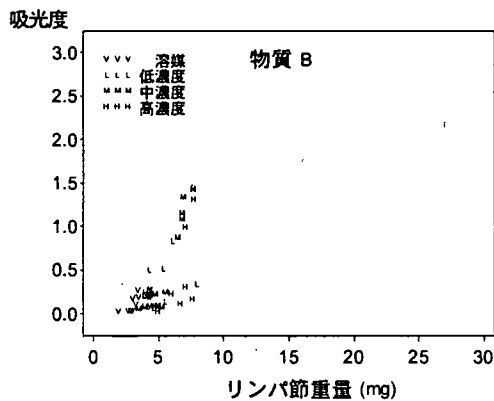


図3. 各施設におけるBrdU取り込み量 (吸光度の分布)

3.4.3 リンパ節重量とBrdU取り込み量の関係

リンパ節重量と吸光度の関係を評価できる物質の結果のみを図4に示す。リンパ節重量と吸光度の間に直線的な関係があるものもあったが、直線関係にないと考えられる物質も認められた。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吸光度とリンパ節重量の間に直線的な関係がない場合には、各施設で適切な操作が実施されなかったことを示している。



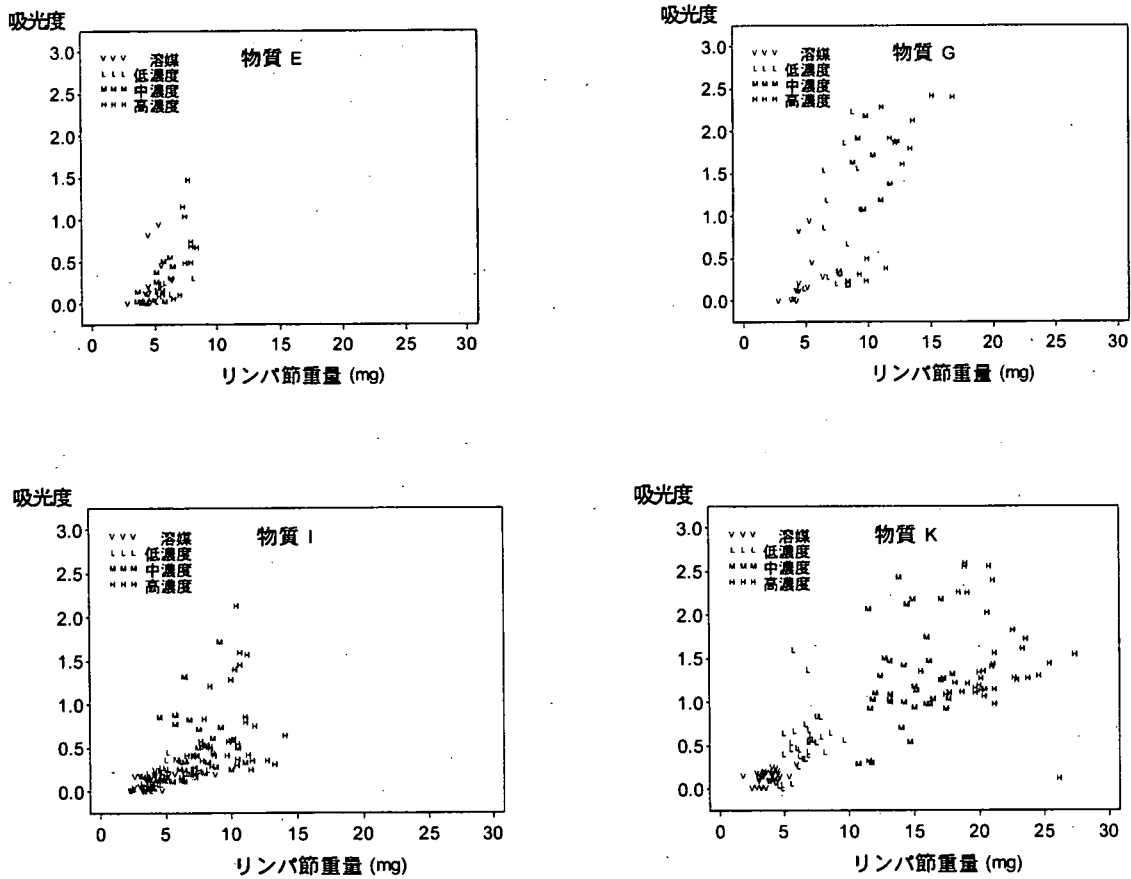


図4. 吸光度とリンパ節重量の関係

3.5 LLNA-BrdU 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した。図5、図6 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。

予備試験および本試験ともいずれも陽性と判定する基準値であるSI 値2を超えていた。しかし、SI値の範囲は予備試験の平均値が2~6であるのに対し、本試験では2~30に上がっていた。この結果からも予備試験と本試験間で施設内および施設間差が極めて大きいと考えられた。

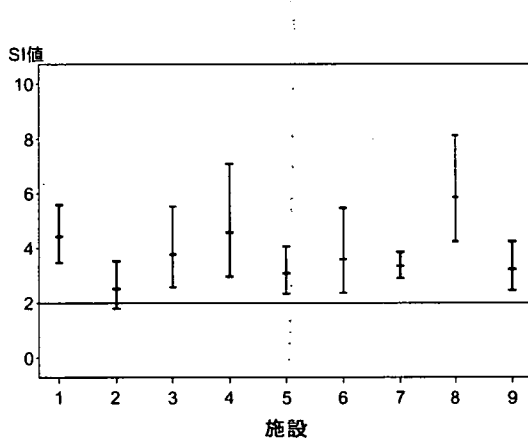


図5. 予備試験のSI値

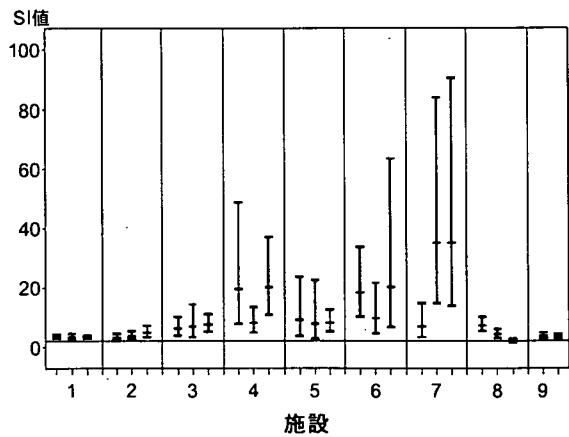
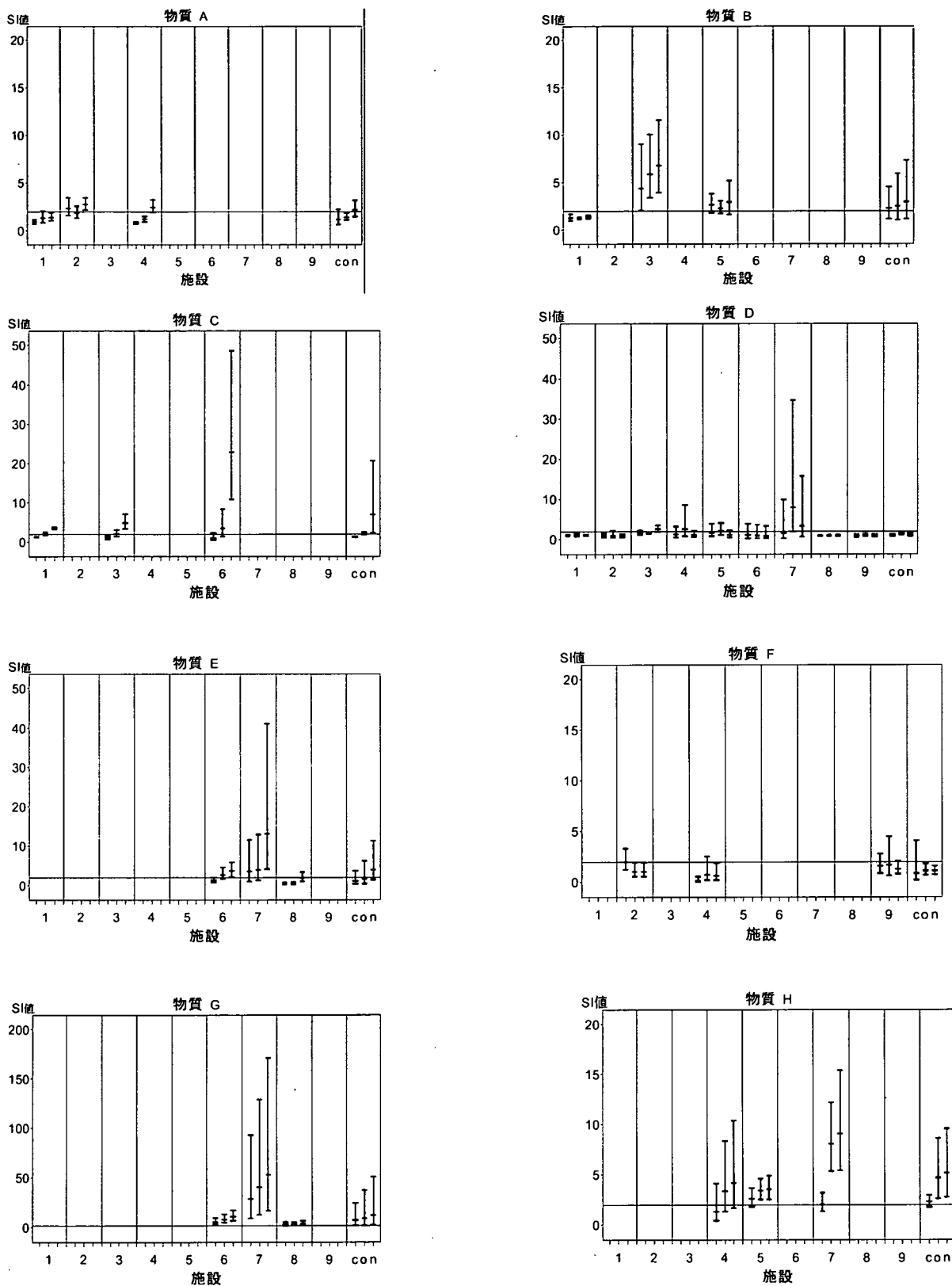


図6. 本試験のSI値

3.6 各被験物質の用量反応関係

図7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。

ほとんどの物質において、各施設のSI値の信頼区間が大きく、正当に評価されていないと判断した。



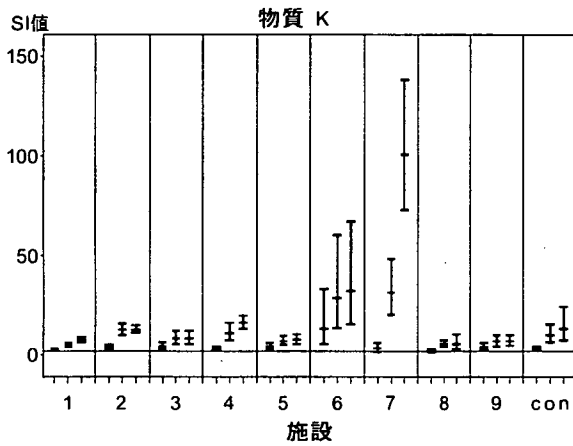
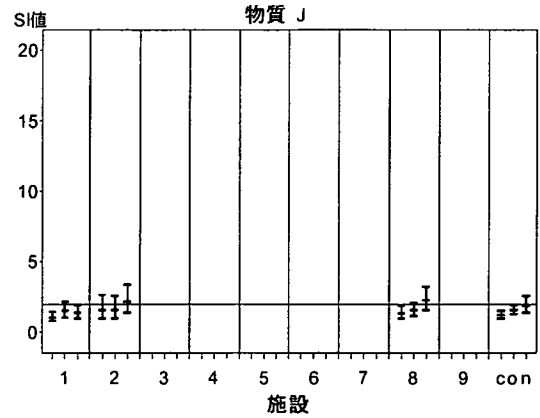
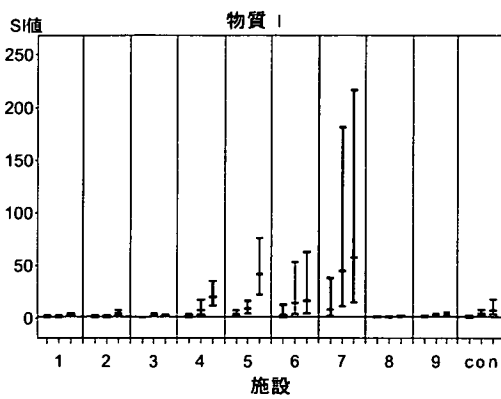


図7. 物質毎に各施設のSI値

3.7 施設内再現性

図5, 図6の結果からほとんどの物質において, 各施設のSI値の信頼区間が大きく, 施設間再現性が良好ではないことが明らかになった。

3.8 施設間再現性

図5~7の結果からほとんどの物質において, 各施設のSI値の信頼区間が大きく, 施設間再現性が良好ではないことが明らかになった。

3.9 代替可能性

この検討を行う以前の問題が解決されていないことから, 比較は実施しなかった。

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) の文献の値を用いる予定であったが, 比較しなかった。対象となる試験法との対応性として, GPMT/BT 法を基準としたが, やはり比較は実施しなかった。

4. 考察

4.1 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 reference test method. The candidate test method should incorporate the essential test method components