

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-BrdU 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た。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と考えた。

4.2 本研究の妥当性

4.2.1 本研究で評価したLLNA-BrdU 法の特徴

本研究で評価した試験法であるLLNA- BrdU法は、感作性の評価に関する原理はLLNA 法と同じである。LLNA-BrdU 法の特徴は、エンドポイントをBrdUの取り込み量としてキットを用いて吸光度の測定とすることである。吸光度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。また、再測定が可能である。

4.2.2 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4)の中から12 被験物質を選択した。LLNA 法による文献のEC₂ 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 物質であり、試験物質の選択は妥当と考えた。ブラインドされた被験物質を配布者が事前に調製して送付した理由として、①予備試験なしで使用動物数を抑え、②各被験物質の同一濃度での結果を比較すること、③適用濃度から感作性の強度を予測できないようにする、④溶媒の選択、溶解または懸濁方法の統一化、⑤複数被験物質における用事調製操作の簡便化、ミスの削減が大きな目的であった。そのため、①選択物質も安定性が高いものになった、②実験開始の1週間前に調整し、DMSOを溶媒とする被験物質を除いて冷蔵で送付し、使用までの冷蔵保管を徹底した、③実験時の状態確認および溶解、均一懸濁液の調整を徹底した。結果として、被験物質の安定性を疑問視する声もLLNA-BrdUバリ実行委の中からも上がったが、長短所を比較して事前調整が選択された。また、LLNA-DAバリデーションにおいて溶媒でプラスチック容器が溶けたとの反省をもとに、すべての被験物質溶液はガラス瓶に入れたものが配布された。

表4に示すように、被験物質によっては析出、懸濁などの記録が残されたが、施設間でかけ離れた対処を行っていないことを事後の聞き取り調査などで確認した。

4.2.3 試験法の普及

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を統一した。被験物質名は遮蔽されていたにもかかわらず、9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の施設間再現性は良好でなかったため、これらの配慮は結果に反映されなかった。

4.2.4 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(資料7)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。これらの記録は試料等手配担当者およびデータ解析担当者ですべて確認作業が行われ、不備につ

いては聞き取り調査を実施し、すべての内容を確認した。

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（資料8）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。

4.2.5 個々の被験物質に対する考察

バラツキのない方法の改善が必要なことから、個々の物質について考察しない。

4.3 本研究の限界と今後の課題

本方法は、希釈によって再測定が可能である利点を持つが、これがバラツキを大きくし、結果として施設間差を大きくしてしまった。この研究のSOPでは溶媒群での平均吸光度が0.2を超える場合には細胞液を希釈して測定を行うことと決めていたが、ブランク値を差し引くことおよび下限は決めていなかった。このため希釈しすぎた場合には、細胞がなくなり吸光度が0に近い値を取る施設が現れた（資料11参照）。SI値は、被験物質群と溶媒群のBrdU量取り込み量の比で定義されるので、溶媒群の吸光度が0に近くなると、極端に大きな値をとることになる。これが施設間差の大きかった一因であると考えられた。

実験操作によるバラつきが大きかった点に対して、LLNA-BrdUバリ実行委にて議論し、特に以下の点について対応策、改善点が決まった。

- ① 生理食塩液の容量は実施施設で事前に至適条件を検討の後、変更することが出来るが、陰性対照ウエルの吸光度が0.1-0.2となる条件を採用する。この範囲にあることを実験の成立条件とする。
- ② AOO群または溶媒群の平均吸光度が0.2を超えた場合には細胞浮遊液を更に希釈後、再測定を行う。0.1を下回った場合には解析対象から外す。なお、予め数段階の希釈懸濁液（5～15ml懸濁液を調整し、生理食塩液で希釈した浮遊液）を調製し、同時に測定を行っても構わないが、その際には実験成立条件を満たす1データのみを採用する。
- ③ブランクは差し引く
- ④その他、実験者から上がってきた試験操作法の問題点もSOPに追記する（BrdU腹腔内投与、懸濁液の調整、洗浄・乾燥操作など）

さらに本研究にはいくつかの限界がある。それらについても記載する。

・被験物質について

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。

・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。用事調整でないことから、物質の安定性についてはデータがない限り反論できない。

・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験経験のある施設を選んだ。LLNA-DA法バリデーションから続く試験法への慣れが、推測での選択につながった可能性もある。

5. 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した。検討結果としては、吸光度で測定する溶媒のBrdU取り込み量の大きさにSI値が大きく依存すること、ブランクに関する処置が不明確であったこと、希釈の影響が十分にわかっていなかったことが考えられ、これらを反映させるべきである。

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致します。

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）、正門孝臣（住友化学株式会社）、後藤浩彦（大塚製薬株式会社）、白石明（明治製菓株式会社）、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 Scholes, 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., Kimber, I. and Loveless, S. E. (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., 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., 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, DA., Blaikie, L., Dearman, R. J., Kimber, I., Ryan, C. A., Gerberick, G. F., Harvey P., Evans, P., White, I. R. and Rycroft, R. J. G. (2000) Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* 42, 344-348.
- Basketter, DA., Evans, P., Fielder, R. J., Gerberick, G. F., Dearman, R. J. and Kimber, I. (2002) Local lymph node assay - validation, conduct and use in practice. *Food and Chemical Toxicology* 40, 593-598.
- Basketter, DA., 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., Hattan, D. G. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node 49 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 DA. (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, G. Y. and Basketter, DA. (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, DA., 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, DA., 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, DA., Lea, L., House, R. V., Ladics, G. S., Loveless, S. E. and Hastings K. L. (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, DA., 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. 50
- 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.
- Saïstad, D. M., Hattan, D., Hill, R. N. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. I. the 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.
- Takeyoshi, M., Yamasaki, K., Yakabe, Y., Takatsuki, M. and Kimber, I. (2001). Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicology Letters* 119, 203-208

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

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

実験技術とSOP：武吉正博「takeyoshi-masahiro@ceri.jp」

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

データシートとその送付：寒水孝司「sozu@medstat.med.osaka-u.ac.jp」

計画書，報告書，その他一般事項：小島肇「h-kojima@nihs.go.jp」

実験動物の入荷等：出原賢治「kn_idehara@daicel.co.jp」

以上

資料1 LLNA-BrdU
法バリテーション研究実行委員名簿

番号	氏名	メールアドレス	所属(略記)	勤務先	会員	任命理由	役割
1	大森 崇	omori@pbh.med.kyoto-u.ac.jp	京成大	京都大学大学院医学研究科医療統計学分野	○	バリ委員	データ管理
2	小島肇夫	h-kojima@nihs.go.jp	国立衛研	国立医薬品食品衛生研究所薬理部	○	技術	委員長
3	寒水孝司	sozu@medstat.med.osaka-u.ac.jp	大阪大	大阪大学臨床医工学融合研究教育センター	○	バリ委員	割付とデータ管理・解析
4	吉村 功	isao@ms.kagu.tus.ac.jp	理科大	東京理科大学工学部経営工学科	○	バリ委員	無任所
5	出原賢治	kn_idehara@daicel.co.jp	ダイセル化学	ダイセル化学工業株式会社 評価・解析センター	○	施設代表	動物手配、実験
6	五十嵐良明	ikarashi@nihs.go.jp	国立衛研	国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部	○	施設代表	実験
7	金澤由基子	kanazawa.y@fdsc.or.jp	食薬センター	財団法人食品薬品安全センター薬野研究所 医療用具試験室	○	施設代表	実験
8	武吉正博	takeyoshi-masahiro@ceri.jp	化評研	財団法人 化学物質評価研究機構 日田事業所 試験第四課	○	施設代表	技術指導・実験
9	青儀 巧	t_awogi@research.otsuka.co.jp	大塚製薬	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	○	施設代表	実験
10	田中正志	masashi_tanaka@meiji.co.jp	明治製菓	明治製菓株式会社 医薬開発部門 動態安全性研究所	○	施設代表	実験
11	有馬和範	k.arima@po.rd.taisho.co.jp	大正製薬	大正製薬株式会社, 安全性研究室	○	施設代表	実験
12	湯浅敦子	atsuko_yuasa@fujifilm.co.jp	富士フィルム	富士写真フィルム株式会社CSR推進部環境・品質マネジメント部 素材試験センター	○	施設代表	実験
13	牧栄二	emaki@anpyo.or.jp	安評センター	財団法人食品農薬品安全性評価センター	○	施設代表	実験

資料2 LLNA-BrdU
法バリデーション研究 実行担当者名簿

番号	氏名	担当	メールアドレス	所属(略記)	勤務先
1	上森健至	実験	tk_uemori@daicel.co.jp	ダイセル化学	ダイセル化学工業株式会社 評価・解析センター
2	五十嵐良明	実験	ikarashi@nihs.go.jp	国立衛研	国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部
3	森村智美 古谷真美 志田勝彦	実験	morimura.t@fdsc.or.jp furuva.m@fdsc.or.jp shida.k@fdsc.or.jp	食薬センター	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
4	飯田憲二	実験	iida-kenji@ceri.jp	化評研	財団法人 化学物質評価研究機構 日田事業所 試験第四課
5	後藤浩彦 中桐直人 青儀巧	実験	t_awogi@research.otsuka.co.jp h_goto@research.otsuka.co.jp	大塚製薬	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
6	田中正志 白石明	実験	masashi_tanaka@meiji.co.jp	明治製菓	明治製菓株式会社 医薬開発部門 動態安全性研究所
7	有馬和範 山崎紀世 織原由佳理	実験	k.arima@po.rd.taisho.co.jp kiyo.yamasaki@po.rd.taisho.co.jp yukari.orihara@po.rd.taisho.co.jp	大正製菓	大正製菓株式会社, 安全性研究室
8	小宮千春 吉野幸江 秋元真一	実験		富士フイルム	富士写真フイルム株式会社CSR推進部環境・品質マネジメント部 素材試験センター
9	藤島敦 竹原広	実験	fuiisimi@anpyo.or.jp hiroshi@anpyo.or.jp	安評センター	財団法人食品農薬医薬品安全性評価センター

LLNA-DA法バリデーション研究候補物質リスト

五十嵐、武吉、出原

No.	0206案No	Chemical name	CASRN	Wako (content/%)	溶媒	LLNA	EC3 (%)	Classification※	GPMT/BT	HMT	HPTA	Gerberick potency	Gerberick (2004)	Rank	Basketter 2005 10)	Ehling 2005 9)
1	1	2,4-Dinitrochlorobenzene (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene)	97-00-7	25g 1300	AOO (2)	+ (1)	0.04 (2)	Extreme	+	(1)		Extreme	○	4		
2	3	4-Phenylenediamine (p-)	106-50-3	25g 1500	AOO (2)	+ (1)	0.1 (2)	Extreme	+	(1)	+	(1) Strong	○	4		List
3	4	Glutaraldehyde solution	111-30-8	25ml 700	ACE (2)	+ (2)	0.1 (2)	Extreme				Strong	○	4		Second
4	5	Potassium dichromate	7778-50-9	25g 1100	DMSO (8)	+ (1)	0.14 (8)	Strong	+	(1)	+	(1)		2		
5	6	Cobalt chloride	7648-79-9	25g 1900	DMSO (8)	+ (1)	0.5 (8)	Strong	+	(1)	+	(1)		2		
6	7	Formaldehyde solution (36~)	50-00-0	500ml 680	ACE (2)	+ (1)	0.7 (2)	Strong	+	(1)	+	(1) Strong	○	3		List
7	8	Isoeugenol (mixture of cis and trans)	97-54-1	25g 2500	AOO (2)	+ (1)	1.8 (2)	Moderate	+	(1)	+	(1) Moderate	○	4		Second
8	11	Cinnamic aldehyde (trans-Cinnamaldehyde)	104-55-2	25ml 900(Kanto)	AOO (2)	+ (1)	3.1 (2)	Moderate	+	(1)	+	(1) Moderate	○	4		
9	12	3-Aminophenol (m-)	591-27-5	25g 1500	AOO (2)	+ (1)	3.2 (2)	Moderate	+	(1)	+	(1) Moderate	○	3		
10	14	Hexylcinnamic aldehyde (Hexylcinnamal, α-Hexylcinnamaldehyde)	101-86-0	25ml 1700	AOO (2)	+ (1)	8.4 (2)	Moderate	+	(1)		Moderate	○	4		First
11	15	Eugenol	97-53-0	25g 1050	AOO (2)	+ (1)	12.9 (2)	Weak	+	(1)	+	(1) Weak	○	4		List
12	16	Citral	5392-40-5	25g 2200	AOO (3)	+ (1)	13 (3)	Weak	+	(1)	+	(1)	○	4		
13	17	Abietic acid	514-10-3	5g 2700	AOO (2)	+ (1)	14.7 (2)	Weak	+	(1)	+	(1) Weak	○	3		
14	19	Cyclamen aldehyde (1-(isopropylphenyl)-2-propanal)	103-95-7	5ml 1200	AOO (2)	+ (2)	22.3 (2)	Weak				Weak	○	3		
15	25	Nickel sulfate (Nickel(II) sulfate hexahydrate)	10101-98-1	25g 1050	DMSO (6)	- (1)	>2.5 (6)	False Negative	+	(1)	+	(1)		2		
16	27	Dimethyl isophthalate	1459-93-4	25g 1000	AOO (6)	- (1)	>25 (6)	Negative	-	(1)			○	4		
17	28	Methyl salicylate	119-36-8	25ml 1250	AOO (6)	- (1)	>25 (6)	Negative	-	(1)	-	(1)	○	3		List
18	31	2-Hydroxypropyl methacrylate	923-26-2	25ml 1300	AOO (2)	- (1)	>50 (2)	Negative	-	(1)	+	(1) NC	○	3		
19	32	Isopropanol (2-Propanol)	67-63-0	500ml 1600	AOO (2)	- (1)	>50 (2)	Negative	-	(1)		NC	○	4		List
20	36	Lactic acid (DL-)	598-82-3	500ml 2400	DMSO (2)	- (1)	>25 (2)	Negative	-	(1)		NC	○	1		

GPMT: guinea pig maximization test

BA: Buehler assay

HMT: human maximization test

HPTA: human patch test allergen

nonstd: nonstandard guinea pig tests

ACE: Acetone

参考文献

- Haneke, K. E., et al., (2001). Regulatory Toxicology and Pharmacology 34, 274-286.
- Gerberick, G. F., et al., (2004). Contact Dermatitis 50, 274-288.
- Basketter, D. A., et al., (2000). Contact Dermatitis 42, 344-348.
- Loveless, S. E., et al., (1996). Toxicology 108, 141-152.
- Kimber, I., et al., (1998). J. Toxicol. Environ. Health 53 563-579.
- Basketter, D. A., et al., (1992). Fd. Chem. Toxicol. 30 65-69.
- Basketter, D. A., et al., (1998). Fd. Chem. Toxicol. 36 327-333.
- Basketter, D. A., et al., (1999). American Journal of Contact Dermatitis 10 207-212.
- Ehling, G., et al., Toxicology 212, 69-79 (2005)
- Basketter, D.A. et al., Contact Dermatitis 53, 260-267 (2005)

※Classification
 EC3 value(%) Ptency classification
 >10 ~<100 Weak
 >1 ~<10 Moderate
 >0.1 ~<1 Strong
 <0.1 Extreme

Gerberick, G. F., et al., (2004). Contact Dermatitis 50, 274-288.

標準操作手順書 (Local lymph node assay-BrdU 法)

Local lymph node assay (LLNA) は初回抗原刺激によるリンパ球の増殖反応を指標とする化学物質の感作性をスクリーニング手法(感作性試験)の一つであり、従来の手法に比べ短期間に化学物質のアレルギー性を検出することが可能となる。

本手順書は Bromodeoxyuridine (BrdU)を使用する Non-RI LLNA 法 (BrdU 法) の手順について記載する。

以下に標準的な実験プロトコールを示す。

1. 動物

1.1 使用動物

通常は未妊娠あるいは未経産の 8 週令から 12 週令雌 CBA/JN (日本チャールス・リバー株式会社)を用いる。

1.2 動物種選択の理由

CBA/JN は ICCVAM peer review report 及び OECD TG429 において推奨されている CBA/J の亜系統であるため。

1.3 検疫・馴化・群分け

動物は入荷後、5 日間以上期間検疫・馴化を行い、期間中順調に発育し健全と確認されたマウスを用いて、群分けを行う。

1.4 動物の識別

動物は油性インキによる尾へのマーキング等の適切な方法による識別を行う。

2. 飼育管理及び飼育環境

温湿度は $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、30-70%、明暗サイクルは 12 時間ごと(明:12 時間、暗:12 時間)とする。給餌及び給水は自由摂取とする。

3 群構成

基本的な群構成として、被験物質群に低用量、中用量及び高用量を設け、媒体対照群及び陽性対照群を設ける。

4. 調製

4.1 媒体

アセトンとオリーブ油を 4:1 (v/v)の割合で混和したものアセトン-オリーブ油混液(AOO)が媒体としては最も適している。

その他に、優先順位としてジメチルホルムアミド(DMF)、メチルエチルケトン(MEK)、プロピレングリコール(PG)及びジメチルスルホキシド(DMSO)等の有機溶媒を用いることができるが、溶媒の選択は予備実験を実施し最も高濃度で溶解或いは良好に懸濁可能なものを選択する。

4.2 被験物質及び陽性対照物質

調製濃度は溶解性を基準に適切な媒体を選択し、可能な限り高濃度での実験を行うことが望ましい。被験物質及び陽性対照物質の調製は上記媒体を用いて所定の濃度(0.1%, 1%, 10%, 50%等)に調製する。

陽性対照物質としては50% α -hexylcinnamic aldehyde (HCA)、10% Isoeugenol、1% 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)等を用いることが出来る。

4.3 BrdU

BrdU (Nacalai tesque 製等)は注射用生理食塩液(大塚製薬工場製等)を用いて10mg/mlになるように調製し、完全に溶解した後、濾過滅菌を行う。使用当日に調製することが望ましいが、事前に調製する場合には、調製物を使用日まで-20℃以下で凍結保存し、投与日に解凍して使用する。

5. 感 作

5.1 感作手順

- 1) 保定者は、薬指と小指で尾をはさみ、親指と人差し指で頭部を保定し(気道は必ず確保する)、耳介を広げて保定する。

図(マウス保定)

- 2) 実験者は、マイクロピペッターを用いて耳介にそれぞれ25 μ Lずつ塗布する。
- 3) 塗布量は25 μ Lと少量であるが、流れ落ちないように注意し、数回に分けて塗布を行う。尚、保定及び投与は一人で行うことも可能である。

5.2 投与回数及び時刻

毎日、ほぼ一定の時刻に1日1回、3日間反復適用する。

6. BrdUの投与

注射針と注射筒(テルモ株式会社等)を用いて0.5 mL/匹を最終感作の約48時間後に1回腹腔内投与する。

図(被験物質投与)

7. 耳介リンパ節の採取

- 7.1 BrdU 投与の約 24 時間後にマウスを頸椎脱臼によって安楽死させた後、仰臥位にし下顎から頸部まで 70%エタノールで消毒する。
- 7.2 下顎から頸部まで正中線に沿って切皮後、皮下組織を剥離し、耳介下まで露出させる。
- 7.3 耳の直下に耳介リンパ節があるので注意深く探し、採取する。

図(リンパの位置)

- 7.4 耳介リンパ節には余分な脂肪組織がつかないように丁寧に取り除く。
- 7.5 採取した耳介リンパ節における BrdU 取り込み量を後日測定する場合は、重量測定後各個体毎の耳介リンパ節を識別した後、 -20°C 以下で凍結保存する。

8. BrdU 取り込み量の測定

8.1 材料及び使用機器

- ペレットペッスル付 1.5 mL チューブ (下図参照)
Pestles & Tubes (BEL-ART PRODUCTS Cat No. 19923-0000)

図 (ペレットペッスル付チューブ)

- ナイロンメッシュ (セルストレーナ、ファルコン #REF352350 (70 μm , 225 メッシュ))
- 20 mL プラスチック容器
- 50 mL 遠心管
- 96 well ELISA 用マイクロプレート
- 蒸留水
- 生理食塩液
- 測定キット (Roche Applied Science 社製 Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) , Cat No. 11647229001)
- 遠心機(300×G 程度でマイクロプレートの遠心操作が可能なもの。)
- マイクロプレートリーダー (370-492nm 或いは 450nm-650nm の測定が可能なもの)

8.2 試薬の調製

1) Anti-BrdU-POD 液

Anti-BrdU -POD stock solution (Anti-BrdU-POD (バイアル)に 1.1 mL の蒸留

水を加え、10 分間放置後、十分に混ぜる)を Antibody dilution solution で 100 倍希釈する。

2) Washing solution 液

Washing buffer concentrate を蒸留水で 10 倍希釈する。

3) 1M 硫酸 (反応停止液を使用する場合)

市販の濃硫酸を蒸留水で希釈し、1M 溶液を調製する。

8.3 前処理 (細胞浮遊液の調製)

- 1) カップに生理食塩液を 15 mL 用意する。
- 2) リンパ節の入った 1.5 mL チューブに 300-500 μ L 生理食塩液を入れペレットペッスルでつぶしながらリンパ球を分散させる。
- 3) 50 mL のチューブにナイロンメッシュを取り付け、懸濁液を濾した後、パスツールピペット等を用いて使い残りの生理食塩液で洗いこむ。

*上記の方法の他、2 枚のスライドガラスのスリ部分を利用して物理的に破碎・懸濁させることも出来る。但し細胞懸濁液の最終容量は 15 mL となるようにする。

8.4 測定準備及び測定

- 1) 細胞浮遊液を均一に分散させた後 96 well プレートに 100 μ L 分注する (N=3)。
- 2) 分注したプレートを 300 \times G、10 min 遠心する。
- 3) 上清を吸引除去する。
*この際、全量の 3/4 程度を吸引する。全量近くを吸引すると細胞も同時に吸引され、バラツキの原因となる。
- 4) 温風式乾燥機で 20 min 乾燥させる (乾燥中はマイクロプレートのふたはかぶせない)。

写真 (実施例)

- 5) マイクロプレート底面が完全に乾燥していることを確認した後、Fix Denat (測定キットに含まれる)を 200 μ L 添加し 30 min 静置する。
- 6) Fix Denat を捨て、ペーパータオルの上で水分を取る。
- 7) Anti-BrdU-POD 液を 100 μ L 添加し室温で 1 時間放置する。
- 8) Anti-BrdU-POD 液を捨てペーパータオルの上で水分を取る。
- 9) Washing solution 液を 200 μ L 添加し、プレートの中でピペッティング後(10 回/well)、液を捨てる操作を 3 回繰返す。
- 10) Washing solution 液を捨てペーパータオルの上で水分を取る。
- 11) TMB 発色基質を 100 μ L 添加し暗所(機の引出し等)に入れ、15 min 放置す

る。

*反応時間は5-30分の間で適当な時間に設定可能であるが、十分に呈色反応が進行する時間に設定する。

- 12) 放置後、マイクロプレートリーダーで370nmを測定波長、492nmを参照波長として2波長測定を行う。

*マイクロプレートリーダーのフィルターの関係等で490nmを測定波長とする場合は反応停止液(1M 硫酸)を1ウェル当たり2 μ L添加した後、650nmを参照波長として2波長測定を行う。

8.5 測定に用いなかった試料の保管

- 1) 細胞懸濁液はそのまま冷所にて24時間は保存、再測定が可能である。

9 結果の評価

各個体のBrdU測定値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値及びその標準偏差及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。

参考文献

Takeyoshi, M., Yamasaki, K., Yakabe, Y., Takatsuki, M. and Kimber, I., 2001. Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. Toxicology Letters 119, 203-208

LLNA-BrdU法バリデーション研究
本実験実施日程

2006年8月7日
ダイセル化学工業(株) 出原賢治

番号	施設	委員	10月16日	10月23日	10月30日	11月6日	11月13日	11月20日	11月27日	12月4日
1	ダイセル	出原	◎	◎	x	x	△	◎	x	○
2	国衛研	五十嵐	x	x	◎	◎	x	○	△	△
3	食薬センタ	金澤	△	○	◎	○	◎	○	◎	○
4	化評研	武吉	○	○	○(48匹)	○	○(48匹)	○	○	○
5	大塚製薬	青儀	x	△	△	○	△	○	○	○
6	明治製菓	田中	○	○	○	○	○	○	○	○
7	大正製薬	有馬	○	x	x	x	○	○	x	○
8	富士フィルム	湯浅	◎	◎	◎	○	○	○	○	x
9	安評センタ	牧	◎	x	x	◎	x	x	◎	x
希望=◎、可能=○、困難=△、ダメ=xという記号で記入をお願いします。										
動物必要数(匹)			144	144	156	144	156	144	108	0
										計
										996

希望調査に従って、実施計画を作成しました。

日付は動物入荷週です。「LLNA-BrdU法バリ本実験日程案-060623.xls」を参照の上、ご覧下さい。

黄色に色付けした週に入荷していただくこととなります。化評研さんの(48匹)の週は、3物質を評価します。案を作るに当たり、以下の点を考慮いたしました。

- ・◎は優先とし、△は避けることを原則としました。
- ・1週あたり4施設を最大としました。
- ・最終週は予備と位置づけ、実験を入れないこととしました。

LLNA-BrdU法 本実験用データシート(第1期)

塗りつぶされたセルにデータを入力してください

実験施設名	化評研
記録者名	

投与開始日		月		日
データ入力最終確認日		月		日

	群 番号	群内 番号	体重(g)		リンパ節 重量(mg)	吸光度			吸光度 個体平均	吸光度 群内平均	SI値
			1日目	6日目		1系統	2系統	3系統			
溶媒 (陽性対照用)	1	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		3							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		4							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
陽性対照	2	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		3							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		4							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
溶媒 (被験物質用)	3	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		3							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		4							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
被験物質 B 低濃度	4	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		3							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		4							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
被験物質 B 中濃度	5	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		3							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		4							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
被験物質 B 高濃度	6	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		3							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		4							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
被験物質 L 低濃度	7	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		3							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		4							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
被験物質 L 中濃度	8	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		3							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		4							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
被験物質 L 高濃度	9	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		3							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		4							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

体重, リンパ節重量は小数点以下1桁まで入力してください

吸光度は参照波長の値を引いた値を小数点以下3桁まで入力してください

吸光度が測定限界値を超えたときは, 限界値を入力し, その旨を下記のコメント欄に入力してください

データが欠測となった場合はピリオド「.」を入力して, 理由をコメント欄に入力してください

コメントがあれば枠内に入力してください

--

データシート作成日 2006年10月20日