

LLNA-BrdU法 本実験用データシート(第2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	化研研
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!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
陽性対照	2	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
溶媒 (被験物質用)	3	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
被験物質 J 低濃度	4	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
被験物質 J 中濃度	5	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
被験物質 J 高濃度	6	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
被験物質 I 低濃度	7	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
被験物質 I 中濃度	8	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
被験物質 I 高濃度	9	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
被験物質 A 低濃度	10	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
被験物質 A 中濃度	11	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
被験物質 A 高濃度	12	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#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

LLNA-BrdU法 本実験用データシート(第3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!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
陽性対照	2	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
溶媒 (被験物質用)	3	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
被験物質 C 低濃度	4	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
被験物質 C 中濃度	5	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
被験物質 C 高濃度	6	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
被験物質 K 低濃度	7	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
被験物質 K 中濃度	8	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
被験物質 K 高濃度	9	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
被験物質 D 低濃度	10	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
被験物質 D 中濃度	11	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#DIV/0!		
被験物質 D 高濃度	12	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3							#DIV/0!		
		4							#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「-」を入力し、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

LLNA-BrdU法 本実験用データシート(再測定)

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	化研研
記録者名	

再測定	
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!		
		3								#DIV/0!	
		4								#DIV/0!	
陽性対照	2	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3								#DIV/0!	
		4								#DIV/0!	
溶媒 (被験物質用)	3	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3								#DIV/0!	
		4								#DIV/0!	
被験物質 低濃度	4	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3								#DIV/0!	
		4								#DIV/0!	
被験物質 中濃度	5	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3								#DIV/0!	
		4								#DIV/0!	
被験物質 高濃度	6	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3								#DIV/0!	
		4								#DIV/0!	
被験物質 低濃度	7	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3								#DIV/0!	
		4								#DIV/0!	
被験物質 中濃度	8	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3								#DIV/0!	
		4								#DIV/0!	
被験物質 高濃度	9	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3								#DIV/0!	
		4								#DIV/0!	
被験物質 低濃度	10	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3								#DIV/0!	
		4								#DIV/0!	
被験物質 中濃度	11	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3								#DIV/0!	
		4								#DIV/0!	
被験物質 高濃度	12	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!		
		3								#DIV/0!	
		4								#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

皮膚感作性試験代替法(LLNA-BrdU法)
バリデーション研究

LLNA-BrdU法 データシート入力の手引き

2006年10月18日版

大阪大学臨床医工学融合研究教育センター
日本動物実験代替法学会
バリデーション委員会委員

寒水孝司(Sozu Takashi)

目次

- データシートの種類とイメージ
- 入力前の確認事項
- 入力方法
- 入力上の注意事項
- LLNA-DA法のバリデーション研究で生じた
問題事項
- データシートの送付先

本テキストは予備実験と本実験の両者を対象にしています

データシートの種類

- 予備実験用
- 本実験用
- 使用ソフト
 - Windows XP
 - Office Excel 2003
- 各担当者にメールにて送付

3

データシートのイメージ (予備実験用)

LLNA-BrdU法 予備実験用データシート
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	投与開始日	月	日				
記録者名	データ入力最終確認日	月	日				

	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			
浴媒 (犠牲対照用)	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
	2							#DIV/0!		
	3							#DIV/0!		
	4							#DIV/0!		
犠牲対照	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
	2							#DIV/0!		
	3							#DIV/0!		
	4							#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
 吸光度は参照液系の値を引いたものを小数点以下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記載してください
 データが欠測となった場合は「リオド」を入力して、理由をコメント欄に記載してください
 コメントがあれば枠内に記入してください

4

データシートのイメージ (本実験用)

シートは
複数あります

LLNA-BrdU法 本実験用データシート(第1期)
※作り直されたらACにデータを入力してください

実験施設名: 施設名: 研究者: 氏名 月 日 日
記録者名: データ入力者氏名: 月 日 日

シート番号	シート名	測定回数	測定日	測定時間	測定結果			備考
					1期	2期	3期	
1	初期対照	1						
		2						
		3						
		4						
2	初期対照	1						
		2						
		3						
		4						
3	初期対照	1						
		2						
		3						
		4						
4	被験物質 Y 低濃度	1						
		2						
		3						
		4						
5	被験物質 Y 中濃度	1						
		2						
		3						
		4						
6	被験物質 Y 高濃度	1						
		2						
		3						
		4						
7	被験物質 X 低濃度	1						
		2						
		3						
		4						
8	被験物質 X 中濃度	1						
		2						
		3						
		4						
9	被験物質 X 高濃度	1						
		2						
		3						
		4						

※ 備考: コメント欄には4桁以下(両側)で入力してください
 ※ 測定日(測定回数)の欄には測定日(測定回数)を入力してください
 ※ 測定者が測定結果を記入したときは、測定者を入力し、その番号下記のコメント欄に入力してください
 ※ データが欠損となった場合は「N/A」と入力して、毎測定コメント欄に入力してください
 ※ コメントが複数12桁以内に入力してください

5

入力前の確認事項(1)本実験

■ 実験施設名に間違いがないか

実験施設名	大阪大学	要確認
記録者名	代登 功	

■ シート数に間違いがないか

- 国立衛研 2枚(第1期・第2期)+1枚(再測定)
- その他の施設 3枚(第1期・第2期・第3期)+1枚(再測定)

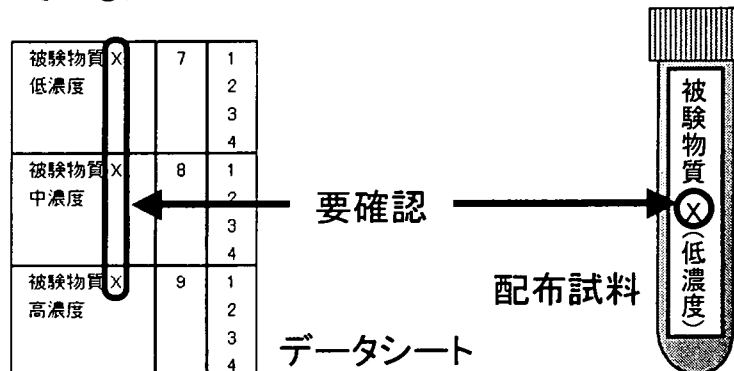
22	被験物質 A	4	1	
23	低濃度		2	
第1期/第2期/第3期/再測定				

要確認

6

入力前の確認事項(2)本実験

- データシート上の被験物質コード(アルファベット)と実際の配布試料のラベルのコードが一致しているか



7

入力方法(1)

- 実験施設名
 - 予備実験: 選択式
 - 本実験: 事前入力(内容を確認)
- 記録者名
 - 記入式(例: 代替 功)
- 投与開始日
データ入力最終確認日(月・日)
 - 選択式

8

入力方法(2)

- 体重(g)
 - 記入式, 小数点以下1桁, 範囲(10.0~50.0)
- リンパ節重量(mg)
 - 記入式, 小数点以下1桁(2桁目まで入力しても構いませんが, 解析は小数点以下1桁までしか使用しません), 範囲(0.0~50.0)
- 吸光度
 - 記入式, 小数点以下3桁, 範囲(0.000~3.000)
 - 参照波長の測定値を引いた値を入力してください
 - 値がマイクロプレートリーダーの測定限界値を超えたときは, 測定限界値を入力し, その旨をコメント欄に入力してください

9

入力上の注意事項(1)

- 色つきのセルに必要なデータを入力・選択してください(それ以外のセルは入力・選択できません)
 - 行・列の追加・削除, シート名の変更, 保護の解除は行わないでください
- セルを選択するとコメントが表示されます
 - 日本語の記入は全角文字, 数字とアルファベットは半角文字にしてください

10

入力上の注意事項(2)

- 体重, リンパ節重量, 吸光度のデータが欠測となった場合は「.」(半角ピリオド)を入力して, その理由をコメント欄に入力してください
- 特記事項は, コメント欄に入力してください
- 吸光度の平均, 群内平均, SI値はデータシート上で自動計算されます

11

入力上の注意事項(3)

- 陰性対照(溶媒)の平均吸光度が0.2を超えたために再測定を行った場合は, 再測定用のデータシートを使用してください
 - 細胞液を更に希釈した場合は, 希釈率をコメント欄に入力してください
 - 再測定を行った旨を, 該当するデータシートのコメント欄に入力してください
 - 再測定用のデータシートで「投与開始日」の代わりに該当する「実験期間(第1期, 第2期, 第3期)」を入力(選択)してください

12

LLNA-DA法のバリデーション研究で生じた問題事項

- 古いバージョンのデータシートの使用
- データ入力最終確認日の未入力
- 群番号と被験物質の非対応
- 記録用紙のデータの転記ミス

13

もう一度確認してください

- データを送付する際には、色つきのセルに必要なデータが入力・選択されているかを再度確認してください
- 記録用紙とデータシートの内容が合っているかを確認してください
- データシートのファイル名はこちらで変更しますので、特に気にしないでください
- 記録用紙はコピーを送ってください

14

データシートの送付先

- 寒水孝司
- Email: sozu@medstat.med.osaka-u.ac.jp
- 〒565-0871
大阪府吹田市山田丘2-2
大阪大学大学院医学系研究科 J6
(内科系臨床医学専攻 情報統合医学講
座医学統計学)
- TEL: 06-6879-3597

SI 値とその 95%信頼区間の計算法

2007 年 2 月 23 日

大森 崇, 寒水 孝司

LLNA-DA 法では、感作性の判定に被験物質群の平均 ATP 発光量をその被験物質の溶媒群の平均 ATP 発光量で除した指標である Stimulation index (SI 値) を用いる。ここでは LLNA-DA 法バリデーション研究で採用した SI 値の 95% 信頼区間の構成法について記載する。

被験物質群を示す記号を Y、溶媒群を示す記号を X で表すことにし、1 回の実験の被験物質群、溶媒群の平均 ATP 発光量をそれぞれ Mean(Y)、Mean(X)、ATP 発光量の標準偏差をそれぞれ SD (Y)、SD (X)、個体数をそれぞれ N(Y)、N(X) とする。これらの記号を用いたとき SI 値は

$$\text{SI値} = \frac{\text{Mean}(Y)}{\text{Mean}(X)} \quad (1)$$

となる。SI 値の推定量の分散を Var(SI 値) とすると、この計算にはしばしば

$$\text{Var}(\text{SI値}) = \frac{\text{SD}(Y)^2}{N(Y) \times \text{Mean}(X)^2} \quad (2)$$

が用いられる。しかしながら、この分散の計算では (1) 式の分子である被験物質群のばらつきだけが反映されており、分母である溶媒群のばらつきは考慮されていない。つまり、この方法で分散を計算すると SI 値の小さなところでは SI 値のばらつきを過小評価する可能性がある。

これを回避するための一つの方法は、まずデルタ法で対数変換後の SI 値の分散を計算し、得られた値を用いて再びデルタ法により SI 値の分散を計算することであろう。

デルタ法によって得られる対数変換後の SI 値の分散を Var(ln SI 値) とすると、

$$\text{Var}(\ln \text{SI値}) = \frac{\text{SD}(Y)^2}{N(Y) \times \text{Mean}(Y)^2} + \frac{\text{SD}(X)^2}{N(X) \times \text{Mean}(X)^2} \quad (3)$$

となるので、(3)式を用いてデルタ法を適用したときの Var(SI 値)は

$$\text{Var}(\text{SI値}) = (\text{SI値})^2 \times \text{Var}(\ln \text{SI値}) \quad (4)$$

となる。

SI 値の 95%信頼区間は、

$$SI \pm 1.96 \times \sqrt{\text{Var}(\text{SI 値})} \quad (5)$$

として得ることもできるが、(5)式による信頼区間の計算法では、信頼区間の下限が 0 より小さくなる可能性がある。この問題を回避する一つの方法は、対数変換後の SI 値の信頼区間を作り、指数をとることである。つまり、

$$\exp(\ln(\text{SI 値}) \pm 1.96 \sqrt{\text{Var}(\ln \text{SI 値})}) \quad (6)$$

である。この 95%信頼区間は、SI 値の推定値について左右対称の区間ではないものの、信頼区間の下限は 0 より大きくなる。

LLNA・DA 法バリデーション研究では、(3) 式による対数変換後の SI 値の分散の計算に基づいた (6) 式の 95%信頼区間を採用した。

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

2007年2月23日

大森 崇, 寒水 孝司

ここでは、LLNA-DA 法のバリデーション研究で用いた施設間再現性、施設内再現性の評価のための指標について記載することにする。また、LLNA-DA 法のバリデーション研究では、個々の被験物質の代表値として、重み付き平均を算出したが、この重み付き平均は、施設間再現性の指標と関連しているので、これについても合わせて記載する。

施設間再現性の指標

全部で m 施設がある状況を想定し、施設を表す添え字として i を用いる ($i=1, \dots, m$)。また、被験物質群に相当する記号として Y を、溶媒群に相当する記号として X を用いる。

第 i 施設で、ある被験物質について 1 回の LLNA-DA 法の実験を行うこととする。この被験物質群の平均 ATP 発光量を $\text{Mean}(Y)_i$ 、被験物質に対応した溶媒群の平均 ATP 発光量を $\text{Mean}(X)_i$ とし、各群の標準偏差をそれぞれ $\text{SD}(Y)_i$ 、 $\text{SD}(X)_i$ 、個体数をそれぞれ $N(Y)_i$ 、 $N(X)_i$ とする。これらの記号を用いた場合、第 i 施設である被験物質について計算した Stimulation index (SI 値) を SI 値 $_i$ とすると

$$\text{SI 値}_i = \frac{\text{Mean}(Y)_i}{\text{Mean}(X)_i} \quad (1)$$

で計算できる。

SI 値は比で定義される指標であるので、0 から無限大の間の値をとる。このため、SI 値の分布は歪んだ分布となるであろう。SI 値を対数変換することは、この歪みを緩和するための一つの方法となるので、以下では対数変換した SI 値(本稿ではこれを $\ln(\text{SI 値})$ と表記する)を考える。つまり、第 i 施設のある被験物質に対する 1 回の実験の $\ln(\text{SI 値})$ は

$$\ln(\text{SI 値}_i) = \ln\left(\frac{\text{Mean}(Y)_i}{\text{Mean}(X)_i}\right) \quad (2)$$

である。

別添 7 で示したように、デルタ法を用いると第 i 施設のある $\ln(\text{SI 値}_i)$ の分散は

$$\text{Var}(\ln(\text{SI 値}_i)) = \frac{\text{SD}(Y)_i^2}{N(Y)_i \times \text{Mean}(Y)_i^2} + \frac{\text{SD}(X)_i^2}{N(X)_i \times \text{Mean}(X)_i^2} \quad (3)$$

であり、これは第 i 施設である被験物質に関して実施した 1 回の実験の、実験内のばらつきを示している。

$\ln(\text{SI 値}_i)$ の値は、ある被験物質に関する 1 回の実験によって得られた測定値の平均値で計算される値であるから、ばらつきを伴う値である。そこで、この $\ln(\text{SI 値}_i)$ が、ある値 θ_i を中心にばらついていると考えることにして、平均が θ_i 、分散が $\text{Var}(\ln(\text{SI 値}_i))$ の正規分布に従っていると仮定する。ここで θ_i に添え字 i がついてるのは、この値が施設によって異なっていることを示しているからである。つまり、同じ物質について施設ごとに実験を行った際に、この θ_i の値が異なることを許した想定を考えていることになる。したがって、各施設の θ_i のばらつきを表現する指標を、施設間再現性の指標として用いることができるであろう。ばらつきをあらわす指標として分散を用いることにすると、 θ_i の分散を求めればよいということになる。このことを実現するために、各 θ_i が平均 θ 、分散 τ^2 の正規分布に従っていると仮定する。この仮定のもとでは分散 τ^2 が θ_i の分散となるので、施設ごとに得られるある被験物質の 1 回の実験の測定値から計算された $\ln(\text{SI 値}_i)$ と $\text{Var}(\ln(\text{SI 値}_i))$ の値を用いて、この値を推定することにする。

上記の仮定の下、具体的に τ^2 を推定する方法はいくつかあり、条件付最尤法はそのような推定法の一つである。詳細は省略するが条件付最尤法を用いると τ^2 は

$$\tau^2 = \frac{\sum_i w_i^2(\tau^2) \left(\frac{m}{m-1} (\ln(\text{SI 値}_i) - \text{WM}_{\text{REML}})^2 - \text{Var}(\ln(\text{SI 値}_i)) \right)}{\sum_i w_i^2(\tau^2)} \quad (4)$$

ただし、 $w_i^2(\tau^2) = 1/(\text{Var}(\ln(\text{SI 値}_i)) + \tau^2)$ 、 $\text{WM}_{\text{REML}} = \sum_i w_i(\tau^2) \ln(\text{SI 値}_i) / \sum_i w_i(\tau^2)$

の解となる。ここで (4) 式は左辺と右辺に τ^2 を含んでおり、 τ^2 について他の変数で書き下すことはできない。しかし、SAS の MIXED プロシジャなどのソフトウェアを用いて、反復計算によって τ^2 の推定値を得ることができる。

τ^2 は対数変換後の SI 値の施設間再現性の指標となるが、我々は SI 値のスケールに戻した $\exp(\tau^2)$ を LLNA-DA 法バリデーション研究の施設間再現性の指標として用いた。 τ^2 が分散の値なので 0 以上の値をとるため、 $\exp(\tau^2)$ は 1 以上の値をとることになる。つまり、 $\exp(\tau^2)$ が 1 に近いほど施設間再現性の能力は高いとい

うことになる。

施設内再現性

前項では施設間再現性の指標として $\exp(\tau^2)$ を説明したが、添え字 i を施設の違
いではなく、ある施設内での繰り返しを示す記号として考えれば $\exp(\tau^2)$ を施設
内再現性の指標として用いることができることがわかる。この理由のため
LLNA-DA 法バリデーション研究では、施設内再現性の指標としても $\exp(\tau^2)$ を用
いた。

重み付き平均とその 95%信頼区間

(4) 式における MW_{REML} は $w_i^2(\tau^2)$ を重みとした重み付き平均である。
LLNA-DA 法バリデーション研究では、個々の被験物質の代表値として SI
値の重み付き平均を用いたが、これは (4) 式の反復計算によって推定した τ^2 を
使って計算したものに指数をとった値である。つまり、

$$\text{SI値の重み付き平均} = \exp\left(\frac{\sum_i w_i(\tau^2) \ln(\text{SI値}_i)}{\sum_i w_i(\tau^2)}\right) \quad (5)$$

である。この重み付き平均の 95%信頼区間は

$$\exp\left(\frac{\sum_i w_i(\tau^2) \ln(\text{SI値}_i)}{\sum_i w_i(\tau^2)} \pm 1.96 \times \sqrt{\frac{1}{\sum_i w_i(\tau^2)}}\right) \quad (6)$$

として得ることができる。

参考文献

Normand, S. L. T. (1999) Meta-analysis: formulating, evaluating, combining,
and reporting. *Statistics in Medicine* **18**, 321-359.

3) 皮膚感作性試験代替法 LLNA-DA 法の第三者評価

研究要旨

ダイセル化学工業（株）から提案のあった皮膚感作性試験 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-DA 法) は、欧米に比較し RI の管理に厳しい本邦でも容易に実施できることから LLNA 法に比較して利点があると判断された。また、LLNA-DA 法は施設内再現性および施設間再現性が高く、LLNA 法との結果の対応性が高く、皮膚感作性を評価する LLNA 法の代替として有用であると判断された。

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 ATP 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-DA 法の専門家による第三者評価を目的とした。

B. 方法

B-1) 評価委員

委員長*

田中憲穂 (食品薬品安全センター 秦野研究所 遺伝毒性部)

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所)

副委員長

金澤由基子 (食品薬品安全センター 秦野研究所 毒性部) *

委員

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部) *

高木弘毅 (サノフィ・アベンティス株式会社 統計解析室)

筒井尚久 (三菱ウェルファーマ株式会社 創薬研究本部 安全性研究所)

手島玲子 (国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部)

萩野滋延 (株) 資生堂、品質保証センター)

牧 栄二 (財) 食品農医薬品安全性評価センター) *

オブザーバー

笛木 修 (独) 医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部)

B-2) 経緯と方法

ダイセル化学工業（株）から提案のあった皮膚感作性試験 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-DA 法) について、平成 17 年度の厚生労働科学研究班で一次評価が行われた。評価委員会は、本試験法の原法である LLNA 法とほぼ同様の原理による方法であること、ほとんど同一の識別能力を持つこと、RI を用いないこと、簡便であり、比較的短時間で結果が得られるといった利点があると判断した。しかし、行政試験法として評価する為には、更にデータの信頼性や施設間のばらつきについての情報を得る必要があった。そのため、多施設バリデーションの実施を日本動物実験代替法学会 (代替法学会) に依頼した。代替法学会のバリデーション委員会により 14 物質を用いた、17 施設でのバリデーション (第 1 実験: 10 施設、第 2 実験: 7 施設) が実施され、その報告を受けた評価委員会は二次評価を行った。

C. 結果および考察

本試験法の Stimulation Index (SI) 値および感作性の有無における施設間再現性はおおむね良好であった。なお、被験物質の媒体への溶解状態に差がある場合は結果の再現性に影響する可能性が指摘された。また、第 1 実験における 12 被験物質による LLNA 法との対応性の検討結果は感度 87.5%、特異度 75%、正確性 83.3% と良い結果が得られた。第 2 実験の 5 被験物質については Cobalt chloride で施設間のばらつきにより感作性の有無の判定ができなかったが、他の 4 物質の判定は LLNA 法のものと一致した。

これらと申請者の自家試験結果を合わせて全 33 物質で評価した結果、感度、特異性、正確性はいずれも 90% 以上であり、LLNA-DA 法は LLNA 法の代替として有用であるとの結論が得られた。

D. 結論

申請者の提出資料に基づく情報および代替法学会に委託したバリデーションの結果、LLNA-DA 法は、欧米に比較し RI の管理に厳しい本邦でも容易に実施できることから LLNA 法に比較して利点があると判断された。また、LLNA-DA 法は施設内再現性および施設間再現性が高く、LLNA 法との結果の対応性が高く、皮膚感作性を評価する LLNA 法の代替とし

て有用であると判断された。

E. 配布資料

資料 3-1 ダイセル化学工業（株）より提案のあった皮膚感作性試験代替法（LLNA-DA 法）の二次評価報告書

資料 3-2 LLNA-DA 法バリデーション研究報告書（概括）Version 10（2007. 5. 18）

資料 3-3 LLNA-DA 法バリデーション研究（第 1 実験）報告書 Version 2. 1（2007. 6. 27）

資料 3-4 LLNA-DA 法バリデーション研究（第 2 実験）報告書 Version 1. 1（2007. 6. 27）

資料 3-5 LLNA-DA 法バリデーション研究結果報告（説明資料）

資料 3-6 LLNA-DA 法による 31 物質の評価結果（ダイセル化学工業株式会社評価解析センター 出原賢治、2007. 11. 8）

資料 3-7 LLNA 法バリデーション研究における追加資料 被験物質の溶媒中での安定性に関する検討結果（ダイセル化学工業株式会社 評価解析センター 出原賢治、津野真澄、2007. 11. 8）

資料 3-8 平成 19 年度第一回評価委員会議事録

資料 3-9 平成 19 年度第二回評価委員会議事録

ダイセル化学工業（株）より提案のあった
皮膚感作性試験代替法（LLNA-DA 法）の二次評価報告書

日本動物実験代替法学会 評価委員会

委員長*

田中憲穂（食品薬品安全センター 秦野研究所 遺伝毒性部）
大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所）

副委員長

金澤由基子（食品薬品安全センター 秦野研究所 毒性部）*

委員

五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部）*
高木弘毅（サノフィ・アベンティス株式会社 統計解析室）
筒井尚久（三菱ウェルファーマ株式会社 創薬研究本部 安全性研究所）
手島玲子（国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部）
萩野滋延（（株）資生堂、品質保証センター）
牧 栄二（（財）食品農医薬品安全性評価センター）*

オブザーバー

笛木 修（（独）医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部）

（所属は平成 17 年 7 月 30 日現在）

*：平成 16 年 12 月まで田中憲穂が、その後は大野泰雄が委員長を務めた。なお、一次評価の際の委員であった金澤由基子、五十嵐良明および牧栄二は今回の評価の対象となったバリテーションに参画したことから、二次評価には関与しなかった。

皮膚感作性試験代替法（LLNA-DA 法）の二次評価報告書

要旨

ダイセル化学工業（株）から提案のあった皮膚感作性試験 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-DA 法) について、平成 17 年度の厚生労働科学研究班で一次評価が行われた。評価委員会は、本試験法の原法である LLNA 法とほぼ同様の原理による方法であること、ほとんど同一の識別能力を持つこと、RI を用いないこと、簡便であり、比較的短時間で結果が得られるといった利点があると判断した。しかし、行政試験法として評価する為には、更にデータの信頼性や施設間のばらつきについての情報を得る必要があった。そのため、多施設バリデーションの実施を日本動物実験代替法学会（代替法学会）に依頼した。代替法学会のバリデーション委員会により 14 物質を用いた、17 施設でのバリデーション（第 1 実験：10 施設、第 2 実験：7 施設）が実施され、その報告を受けた評価委員会は二次評価を行った。その結果、本試験法の Stimulation Index (SI) 値および感作性の有無における施設間再現性はおおむね良好であった。なお、被験物質の媒体への溶解状態に差がある場合は結果の再現性に影響する可能性が指摘された。また、第 1 実験における 12 被験物質による LLNA 法との対応性の検討結果は感度 87.5%、特異度 75%、正確性 83.3%と良い結果が得られた。第 2 実験の 5 被験物質については Cobalt chloride で施設間のばらつきにより感作性の有無の判定ができなかったが、他の 4 物質の判定は LLNA 法のものと同じであった。

これらと申請者の自家試験結果を合わせて全 33 物質で評価した結果、感度、特異性、正確性はいずれも 90%以上であり、LLNA-DA 法は LLNA 法の代替として有用であるとの結論が得られた。