

プロトコ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。

3.5 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、バリデーション研究の実施に関して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)中心となる施設には提案施設のダイセル化学工業（株）が務め、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提案施設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 での濃度設定をという点が守られていない。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。本研究での濃度設定は、過去に提案施設にて実施された実験の SI 値もしくは LLNA 法の文献値に基づき設定された。

4. 総括

LLNA-DA 法は、GPMT/BT 法に比べて動物数の削減、苦痛の低減、定量的な評価が可能という点で優れており、LLNA 法に比べて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利点がある。

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 14 物質を用いて、全 17 施設の実験実施施設による 2 つのバリデーション研究を実施した結果、LLNA-DA 法は実施しやすい試験法であり、施設間差が小さく、GPMT/BT 法に対する代替可能性は LLNA 法とほぼ同等である試験法であることが確認された。

以上より、LLNA-DA 法は皮膚感作性を評価する試験法として有用である。

LLNA-DA 法バリデーション研究（第1実験）

報告書

Version 2.1

報告書作成日：2007年6月27日

報告書作成責任者：大森 崇

LLNA-DA 法バリデーション研究実行委員

委員長

大森 崇（京都大学大学院医学研究科医療統計学分野）

委員

小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所薬理部）

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）

小坂忠司（財団法人 残留農薬研究所 毒性部）

浦谷 衛（石原産業株式会社 中央研究所 安全科学研究室 安全性グループ）

山中 淳（ピアス株式会社 中央研究所 ARI 評価グループ）

篠田伸介（株式会社 薬物安全性試験センター埼玉研究所 第二毒性部）

中村洋介（住友化学株式会社 情報電子化学業務室）

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）

米田知史（トーアエイヨー株式会社 研究開発部 福島研究所）

花田智彦（日本新薬株式会社 創薬研究所 安全性研究部）

猪田健人（中野製薬株式会社 マーケティング本部研究）

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）

宇佐美雅仁（ホーユー株式会社 総合研究所 基盤技術研究室）

篠田直樹（参天製薬株式会社奈良研究開発センター）

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

略号	原語	意味
ACD	Allergic Contact Dermatitis	
AOO	Acetone/Olive Oil	
ATP	Adenosine triphosphate	
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 Validation 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	
SLS	Sodium Lauryl Sulfate	
SOP	Standard Operating Procedure	

目次	
はじめに	6
要約	7
1. 背景	8
1.1 皮膚感作性	8
1.2 モルモットを用いた試験法	8
1.3 LLNA 法	8
1.4 LLNA-DA 法	9
1.5 本研究にいたるまでの過程	9
1.6 本研究の目的	9
2. 方法	10
2.1 組織と役割	10
2.2 LLNA-DA の操作方法	11
2.3 技術研修会	12
2.4 ルミノメータの校正	12
2.5 予備実験	12
2.6 被験物質	13
2.7 割付	13
2.8 試料等の配布	14
2.9 実験実施のスケジュール	14
2.10 データの管理	14
2.11 データベース	15
2.12 データ解析の方法	15
2.12.1 体重, リンパ節重量, ATP 発光量	15
2.12.2 SI 値とその 95%信頼区間の算出	15
2.12.3 施設内再現性, 施設間再現性を評価する方法	15
2.12.4 代替可能性の検討の方法	16
2.12.5 EC3 の算出方法と刺激のカテゴリー	16
2.12.6 ソフトウェア	16
3. 結果	17
3.1 研究の質について	17
3.2 選択された被験物質と割付け結果	17
3.3 データの取り扱いについて	20
3.4 背景基礎データ	23
3.4.1 体重	23
3.4.2 ATP 発光量	24

3.4.3	リンパ節重量とATP発光量の関係	28
3.5	LLNA-DAの分析感度	30
3.6	各被験物質の用量反応関係	31
3.7	施設間の再現性	36
3.8	施設内の再現性	38
3.9	代替可能性	39
3.9.1	感度, 特異度, 一致割合	39
3.9.2	EC3	41
4.	考察	42
4.1	本研究の位置づけと意義	42
4.2	本研究で評価したLLNA-DA法の操作上の特徴	43
4.3	本研究の妥当性	43
4.3.1	被験物質の選択	43
4.3.2	データの質に関して	43
4.3.3	施設内再現性	44
4.3.4	施設間再現性	44
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	45
4.3.6	対象となる試験法のデータとの対応性	45
4.3.7	個々の被験物質に対する考察	45
4.4	本研究の限界と今後の課題	47
5.	結論	48
	謝辞	49
	参考文献	50

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-DA 法バリデーション研究実行委員会が実施したバリデーション研究 (第 1 実験) の報告書の第 2 版である。

本報告書の第 1 版にあたる Version 1.0 は、被験物質を明らかになる前に作成されたため、被験物質に関する事項はすべて割り振られたコードのみで記載された。その後、被験物質が明らかになったため、被験物質コードとともに被験物質名を記し、被験物質が明らかになったことによる考察を追加した。さらに Version 1.0 では記載していなかった個々の施設の SI 値と、施設ごとの判定結果を追記した。また、Version 1.0 に記載していた「研究外の妥当性」、「評価委員による評価結果への返答としてのまとめ」、「SOP について」という項目を別に記すことにして、本報告書から削除した。

この Version 2.1 では、当初作成された Version 2.0 についてバリデーション委員会から得たいくつかの意見を反映させた。大きな変更点は、被験物質の調整日と投与日に関する記述の追記である。

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-DA 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、施設間再現性と代替可能性の検討を主目的とした LLNA-DA 法の多施設バリデーション研究を実施した。

【方法】 本研究は LLNA-DA 法の実験プロトコールに基づいて実施した。 12 の被験物質のうち、 3 物質は全 10 施設で、残りの 9 物質は 3 施設ごとに評価した。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 ATP 発光量に対する被験物質群の ATP 発光量の比 (stimulation index, SI 値) が 3 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 3 被験物質及び 3 施設で評価したその他の 5 被験物質については、施設間のばらつきは小さく、すべての施設の判定が一致した。施設間で判定が一致しなかった 4 物質中 2 物質には明らかな用量反応関係がみられたが、残りの 2 物質 (cobalt chloride と nickel sulfate) はばらつきが大きかった。この原因にはこれら被験物質の溶媒や被験物質の物性が影響している可能性があるかと推察された。GPMT/BT 法に対する LLNA-DA 法の感度、特異度、一致割合はそれぞれ 87.5% (7/8), 100% (3/3), 90.9% (10/11) であり、この結果は同じ被験物質の文献値で算出した GPMT/BT 法に対する LLNA-DA 法の感度、特異度、一致割合と同程度であった。

【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 法と同程度であり、キャッチアップバリデーション研究として受け入れられるものであると思われる。

1. 背景

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ものをいう。ACD は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と認識されている。

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では、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) により実施されてきた (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することにより感作誘導を行うが、BT 法では FCA を用いない。

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 (例えば 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)。

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。しかし、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-DA 法

ダイセル化学工業（株）は、リンパ細胞増殖を検出する指標を ^3H -thymidine の代わりに adenosine triphosphate（ATP）含量に改良した LLNA-DA 法を開発した（Yamashita ら（2005））。また、LLNA-DA 法では LLNA 法と同等の検出感度を得るため投与回数の変更がなされている。この試験法の SOP を資料 4 「LLNA-DA 法プロトコール」に示す。

1.5 本研究にいたるまでの過程

ダイセル化学工業（株）は、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-DA 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、かつ時間のかからない方法であり、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-DA 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の支援により、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

本研究の目的は、LLNA-DA 法を被験物質名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-DA 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

本研究の研究計画は、研究実施前に定められた研究計画書（別添 1）に従い実施された。

2.1 組織と役割

・研究の組織

本研究を遂行するための研究組織，LLNA-DA 法バリデーション研究実行委員会（以下，LLNA-DA 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組織した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。しかしながら，残りの 9 施設の代表者も LLNA-DA バリ実行委として本研究に参加することになった。

LLNA-DA バリ実行委を資料 1「LLNA-DA バリ実行委」に，実験参加施設とその実験担当者を資料 2「実験担当者一覧」に示す。

・各組織の役割

LLNA-DA バリ実行委は，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-DA 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 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溶媒対照、陽性対照(25% 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

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: 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 (ATP 発光量)

試験操作: LLNA-DA 法では 3 日間連続で 1% sodium lauryl sulfate (SLS) 処置 1 時間後に被験物質溶液あるいは懸濁液を 25 μ L ずつ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 phosphate buffered saline (PBS) 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 0.1mL の ATP 抽出試薬が入ったチューブに入れ約 20 秒間静止，発光試薬 0.1mL を添加後ルミノメータにより，表示される ATP 発光量を測定する。

結果の判定：被験物質または陽性対照の ATP 発光量と溶媒の ATP 発光量の比として定義される stimulation index (SI 値) 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。

さらに，確認用の映像資料も配布した。

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 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 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。

2.7 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することにした。

被験物質割付担当者は、表 2.7 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 2.7 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。各実験施設には被験物質のコードが記載されたデータシート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このデータシートファイルに入力した。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となるデータが入力され

ていなかったり、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 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た。

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 $\exp(\tau^2)$ と表記することにした。 $\exp(\tau^2)$ 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。施設内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 値の重み付き平均を求めた後、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
$\geq 10 - \leq 100$	weak
$\geq 1 - < 10$	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、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 被験物質分の実験を実施した。

表 3.2.1 被験物質の割付け

被験物質	感作性*	施設No.									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A: 2,4-dinitrochlorobenzene	+	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B: hexylcinnamic aldehyde	+	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C: 3-aminophenol	+	○		○					○		
D: glutaraldehyde	+	○	○			○					
E: cobalt chloride	+				○		○		○		
F: isoeugenol	+				○	○				○	
G: formaldehyde	+	○	○			○					
H: dimethyl isophthalate	-	○		○				○			
I: isopropanol	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
J: nickel sulfate	-				○		○		○		
K: abietic acid	+		○				○	○			
L: methyl salicylate	-			○				○			○

*:LLNA法の評価結果に基づく感作性の判定

表 3.2.2 に、被験物質の調製日と送付時の物質状態および被験物質の投与日を示す。

表 3.2.2 被験物質の調製日と送付時の物質の状態および被験物質の投与日

施設	物質	調製日	送付時の物質の状態	投与日
1	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/6/6	溶解	2006/6/14
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/4/4	溶解	2006/4/12
	C: 3-aminophenol	2006/6/6	溶解	2006/6/14
	D: glutaraldehyde	2006/5/16	溶解	2006/5/24
	G: formaldehyde	2006/5/16	溶解	2006/5/24
	H: dimethyl isophthalate	2006/6/6	溶解	2006/6/14
	I: isopropanol	2006/4/4	溶解	2006/4/12
2	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/5/9	溶解	2006/5/17
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/4/4	溶解	2006/4/12
	D: glutaraldehyde	2006/5/24	溶解	2006/5/31
	G: formaldehyde	2006/5/24	溶解	2006/5/31
	I: isopropanol	2006/4/4	溶解	2006/4/12
	K: abietic acid	2006/5/9	溶解	2006/5/17
3	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/6/8	溶解	2006/6/28
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/6/6	溶解	2006/6/14
	C: 3-aminophenol	2006/5/30	溶解	2006/6/6
	H: dimethyl isophthalate	2006/6/8	溶解	2006/6/28
	I: isopropanol	2006/6/6	溶解	2006/6/14
	L: methyl salicylate	2006/5/30	溶解	2006/6/6
4	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/5/16	溶解	2006/5/24
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/5/9	溶解	2006/5/17
	E: cobalt chloride	2006/4/11	溶解	2006/4/19
	F: isoeugenol	2006/5/16	溶解	2006/5/24
	I: isopropanol	2006/5/9	溶解	2006/5/17
	J: nickel sulfate	2006/4/11	高濃度で懸濁	2006/4/19
5	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/5/24	溶解	2006/5/31
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/5/30	溶解	2006/6/7
	D: glutaraldehyde	2006/6/6	溶解	2006/6/14
	F: isoeugenol	2006/5/24	溶解	2006/5/31
	G: formaldehyde	2006/6/6	溶解	2006/6/14
	I: isopropanol	2006/5/30	溶解	2006/6/7
6	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/5/30	溶解	2006/6/7
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/6/6	溶解	2006/6/14
	E: cobalt chloride	2006/5/24	溶解	2006/5/31
	I: isopropanol	2006/6/6	溶解	2006/6/14
	J: nickel sulfate	2006/5/24	高濃度で懸濁	2006/5/31
	K: abietic acid	2006/5/30	高濃度で懸濁	2006/6/7

表 3.2.2 被験物質の調製日と送付時の物質の状態および被験物質の投与日 (つづき)

施設	物質	調製日	送付時の物質の状態	投与日
7	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/5/9	溶解	2006/5/17
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/4/11	溶解	2006/4/19
	H: dimethyl isophthalate	2006/5/9	溶解	2006/5/17
	I: isopropanol	2006/4/11	溶解	2006/4/19
	K: abietic acid	2006/4/4	溶解	2006/4/12
	L: methyl salicylate	2006/4/4	溶解	2006/4/12
8	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/5/30	溶解	2006/6/7
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/4/11	溶解	2006/4/19
	C: 3-aminophenol	2006/5/30	溶解	2006/6/7
	E: cobalt chloride	2006/5/16	溶解	2006/5/24
	I: isopropanol	2006/4/11	溶解	2006/4/19
	J: nickel sulfate	2006/5/16	高濃度で懸濁	2006/5/24
9	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/4/11	溶解	2006/4/19
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/4/4	溶解	2006/4/12
	F: isoeugenol	2006/4/11	溶解	2006/4/19
	I: isopropanol	2006/4/4	溶解	2006/4/12
10	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/5/16	溶解	2006/5/24
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/5/24	溶解	2006/5/31
	I: isopropanol	2006/5/24	溶解	2006/5/31
	L: methyl salicylate	2006/5/16	溶解	2006/5/24