

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考えられる。

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 (cobalt chloride) と J (nickel sulfate) 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 (cobalt chloride) 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	LLNA法
	EC3	感作性	EC3	感作性
A: 2,4-dinitrochlorobenzene	0.06	extreme	0.04	extreme
B: hexylcinnamic aldehyde	11.1	weak	8.4	moderate
C: 3-aminophenol	.	negative	3.2	moderate
D: glutaraldehyde	0.3	strong	0.1	extreme
E: cobalt chloride	.	(positive)*	0.5>	strong
F: isoeugenol	1.9	moderate	1.8	moderate
G: formaldehyde	3.0	moderate	0.7	strong
H: dimethyl isophthalate	.	negative	.	negative
I: isopropanol	.	negative	.	negative
J: nickel sulfate	2.7	moderate	.	negative
K: abietic acid	7.9	moderate	14.7	weak
L: methyl salicylate	.	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 の値を算出できなかった。

4. 考察

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 GPMT/BT 法の文献に記載された判定とを比較した。その結果は、同じ 12 物質で評価した LLNA 法の文献に記載された判定と GPMT/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。被験物質名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 法の操作上の特徴

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、この研究で特に以下の点について注意を促した。

- ・ 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測定すること。

4.3 本研究の妥当性

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。

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

を実施し、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 25% HCA-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。陽性対照物質の SI 値は、すべての施設のすべての実験で基準値である 3 を超えた。

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 (2,4-dinitrochlorobenzene), B (hexylcinnamic aldehyde), I (isopropanol)) 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 (3-aminophenol), F (isoeugenol), H (dimethyl isophthalate), K (abietic acid), L (methyl salicylate)) 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。

物質 D (glutaraldehyde) と G (formaldehyde) の 2 物質は、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より高濃度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用量反応がみられかつ高濃度で 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。

被験物質 E (cobalt chloride) と J (nickel sulfate) 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 物質のみが金属塩であり、DMSO を溶媒としていた。さらに両物質とも送付された時点で、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、それぞれ独自の対処がされた。また、DMSO 溶液はマウスへの塗布が困難とされている。すなわち、これら 2 物質における SI 値のかい離は、溶媒に用いた DMSO が関与した可能性がある。

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被験物質が 1 物質 (C (3-aminophenol)) 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 (J (nickel sulfate)) あった。

4.3.7 個々の被験物質に対する考察

被験物質 A (2,4-dinitrochlorobenzene) は、割付に考慮した分類に基づく強 (extream) に分類され、結果は 10 施設のすべてで陽性と判定された。施設 10 で SI 値が 4.71 とやや低めの値をとっているが、これは溶媒の ATP 発光量が大きかったためであると思われる。

被験物質 B (hexylcinnamic aldehyde) は、割付に考慮した分類に基づく弱 (moderate) に分類され、結果は 10 施設のすべてで陽性と判定された。

被験物質 C (3-aminophenol) は、割付に考慮した分類に基づく (moderate) に分類される。3 施設すべてで陰性と判定され、文献の LLNA 法の判定とかい離が生じた。3 施設での、高濃度 (10%) での SI 値の値はそれぞれ 2.83, 1.74, 2.38 であり、すべての施設で陰性と判定された被験物質 H (dimethyl isophthalate) や被験物質 I (isopropanol) での SI 値よりは大きかった。本研

究では、適用濃度が固定されており、より高い濃度での実験は行われなかったが、全体として用量反応関係がみられるので、現実に適用される場合には、より高濃度での実験が行われると思われる。その場合には、陽性と判断される可能性がある。

被験物質 D (glutaraldehyde) は、割付に考慮した分類に基づくと強 (extreme) に分類される。3 施設のうち 2 施設で陽性と判定されたが、1 施設で陰性と判定された。3 施設の高濃度である 0.5% での SI 値はそれぞれ 5.0, 3.39, 2.57 とそれほど大きな値ではなかった。しかし、いずれの施設でも SI 値に用量反応関係があるので、現実には陰性と判定された場合でもより高い用量での実験が行われると思われる。

被験物質 E (cobalt chloride) は、割付に考慮した分類に基づくと強 (strong) に分類される。この物質の施設間差は大きく、3 施設の高用量 (3%) での SI 値はそれぞれ 2.66, 20.55, 8.07 であった。これは、個々の施設での溶媒の ATP 発光量の違いによるところが大きいと思われる。ATP 発光量の値は施設によって桁が異なるほど違いが大きいので、塗布操作に何か問題があったのかもしれない。

被験物質 F (isoeugenol) は、割付に考慮した分類に基づくと弱 (moderate) に分類される。3 施設のすべてで SI 値は 10 より小さく陽性と判定されている。

被験物質 G (formaldehyde) は、割付に考慮した分類に基づくと強 (strong) に分類される。3 施設のうち 2 施設で陽性と判定されたが、1 施設で陰性と判定された。いずれの施設でも SI 値に用量反応関係はあり、高濃度である 5% での SI 値はそれぞれ 4.84, 3.18, 2.69 であった。

被験物質 H (dimethyl isophthalate) は、割付に考慮した分類に基づくと無 (negative) に分類される。3 施設すべてで陰性と判定され、SI 値の用量反応関係もみられなかった。

被験物質 I (isopropanol) は、割付に考慮した分類に基づくと無 (negative) に分類される。10 施設すべてで陰性と判定され、SI 値の用量反応関係もみられなかった。

被験物質 J (nickel sulfate) は、割付に考慮した分類に基づくと無 (negative) に分類される。ただし、この物質の感作性は一般によく知られており、LLNA 法では偽陰性となっている。この被験物質の施設間差は大きく、3 施設の高用量 (10%) での SI 値はそれぞれ 1.03, 11.78, 2.55 であった。この 3 施設は被験物質 E (cobalt chloride) と組みで実験が行われたため、被験物質 E (cobalt chloride) と同様の傾向が生じていると思われる。

被験物質 K (abietic acid) は、割付に考慮した分類に基づくと弱 (weak) に分類される。3 施設の高用量 (25%) での SI 値はすべて 3 を超えており、値は

それぞれ 4.64, 7.96, 3.80 とそれほど大きな値ではなかった。

被験物質 L (methyl salicylate) は、割付に考慮した分類に基づくと無 (negative) に分類される。3 施設すべてで陰性と判定され、SI 値の用量反応関係もみられなかった。

別添 9 に、いくつかの文献で報告されている各物質に関する LLNA 法の SI 値を示した。各物質の対応する濃度と本研究で得られた SI 値とを比べると、陽性と判定された多くの物質の高濃度では LLNA 法の方が高めの傾向を示している。これはエンドポイントの違いに起因すると考えられる。このような傾向はあるものの、カットオフ値として定めた SI 値の判定基準が 3 となる濃度付近では 2 つの方法に大きな差は認められない。

4.4 本研究の限界と今後の課題

本研究には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。一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い、結果の蓄積が必要である。

被験物質 E (cobalt chloride) と J (nickel sulfate) の施設間再現性が悪かった。理由のひとつ溶媒に DMSO が用いられていたことが考えられる。DMSO を溶媒として用いる他の被験物質で追加実験を行う必要があるかもしれない。また、これらの物質は金属塩なので、これらの物質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。

・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, D. A., 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, D. A., 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, 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., Hattan, 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, G. 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. 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, 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. 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.
- 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.

LLNA-DA 法バリデーション研究 (第2実験)

報告書

Version 1.1

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	
ACE	Aceton	
AOO	Acetone/Olive Oil	
ATP	Adenosine triphosphate	
BT	Buehler Test	
EC3		The estimated concentration that yields a stimulation index of three
DMSO	dimethyl sulxocide	
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 LLNA 法	8
1.3 LLNA-DA 法	8
1.4 本研究にいたるまでの過程	9
1.5 本研究の目的	10
2. 方法	11
2.1 組織と役割	11
2.2 LLNA-DA の操作方法	12
2.3 技術研修会	13
2.4 ルミノメータの校正	13
2.5 予備実験	13
2.6 被験物質	14
2.7 割付	14
2.8 試料等の配布	15
2.9 実験実施のスケジュール	15
2.10 データの管理	15
2.11 データベース	16
2.12 データ解析の方法	16
2.12.1 体重, リンパ節重量, ATP 発光量	16
2.12.2 一定の基準を満たす施設の選定方法	16
2.12.3 実施のしやすさの検討	17
2.12.4 SI 値とその 95%信頼区間の算出	17
2.12.5 施設内再現性、施設間再現性を評価する方法	18
2.12.6 ソフトウェア	18
3. 結果	19
3.1 研究の質について	19
3.2 選択された被験物質と割付け結果	19
3.3 データの取り扱いについて	20
3.4 背景基礎データ	22
3.4.1 体重	22
3.4.2 ATP 発光量	23
3.4.3 リンパ節重量と ATP 発光量の関係	25

3.5	LLNA-DA の分析感度	26
3.6	各被験物質の用量反応関係	27
3.7	施設間の再現性	29
3.8	施設内の再現性	30
3.9	一定の基準を満たす施設の選定と実施のしやすさ	31
3.9.1	提案施設の背景データ	31
3.9.2	実験実施施設が一定の基準を満たすかどうかの判定	32
3.9.3	実施しやすさの検討結果	33
4	考察	34
4.1	本研究の位置づけと意義	34
4.2	本研究で評価した LLNA-DA 法の操作上の特徴	35
4.3	本研究の妥当性	35
4.3.1	被験物質の選択	35
4.3.2	データの質に関して	36
4.3.3	施設内再現性	36
4.3.4	施設間再現性	36
4.3.5	LLNA-DA 法の実施のしやすさ	37
4.3.6	個々の被験物質に対する考察	37
4.4	第 1 実験から得られた結果を含めての考察	38
4.4.1	溶媒の ATP 発光量とリンパ節重量	38
4.4.2	物質 B : <i>hexylcinnamic aldehyde</i>	42
4.4.3	物質 E : <i>cobalt chloride</i> と物質 J : <i>nickel sulfate</i>	43
4.5	本研究の限界と今後の課題	44
5.	結論	44
	謝辞	45
	参考文献	46

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 2 実験）の報告書（Version 1.1）である。

この Version 1.1 では、当初作成された Version 1.0 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。Version 1.0 からの大きな変更点は、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を³H-thymidine の取り込み量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 量を用いる方法であり、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。以前に LLNA 法の実施経験がある 10 施設で 12 被験物質を用いて実施したバリデーション研究では、AOO と ACE を溶媒とした 10 の被験物質で良好な結果が得られた。しかし DMSO を溶媒とした 2 つの金属塩では施設間差が大きくその原因が明らかにはならなかった。本研究では、1) 試験法の実施のしやすさの方法の構築とその評価ならびに 2) 金属の適用の可能性と溶媒としての DMSO を用いる物質の追加検討を行う目的で、7 実験実施施設による LLNA-DA 法のバリデーション研究を実施した。

【方法】 実験は本研究用に作成した LLNA-DA 法の standard operating procedure (SOP) に従い実施した。実験を行う前に、提案施設が主導となり技術研修会が実施された。被験物質として選定された 5 物質のうち、1 物質は以前に実施されたバリデーション研究の共通物質が選ばれ全 7 施設で実験を行い、残りの 4 物質は 4 施設ごとに実験を行った。この 4 物質は溶媒が DMSO のものが選ばれ、そのうち 3 物質が金属であった。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。判定基準は溶媒対照群の発光量に対する被験物質群の発光量の比 (stimulation index, SI 値) が 3 を超えた場合に陽性と判定した。また、提案施設の背景データに基づく「一定の基準を満たす施設」の基準を構築した。

【結果と考察】 実験を実施した 7 施設すべてで「一定の基準を満たす施設」と判定された。また、全 7 実験実施施設で評価した 1 被験物質及び 4 実験実施施設で評価したその他の 3 被験物質については、施設間のばらつきは極めて小さく、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 1 物質はどの施設でも高用量で SI 値は 3 付近であり、用量反応関係がみられた。

【結論】 7 実験実施施設による 5 被験物質の結果は、いずれも高い施設間再現性を示した。LLNA-DA 法は金属塩にも使用可能であるが、溶媒として DMSO を用いる場合塗布操作に注意する必要がある。良好な施設間再現性は事前に技術研修を適切に行ったことが大きな要因のひとつであると考えられる。