

表 3.6.1.e 各施設の SI 値 (被験物質 N : potassium dichromate)

被験物質	濃度	施設			
		11	12	15	17
N: potassium dichromate	0.1%	1.90	1.90	2.66	3.25
	0.3%	2.24	2.61	3.89	5.06
	1.0%	4.78	4.08	6.01	6.37

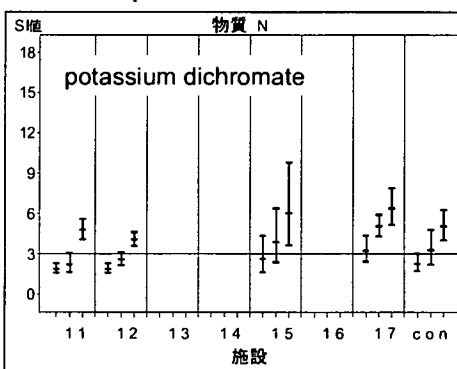
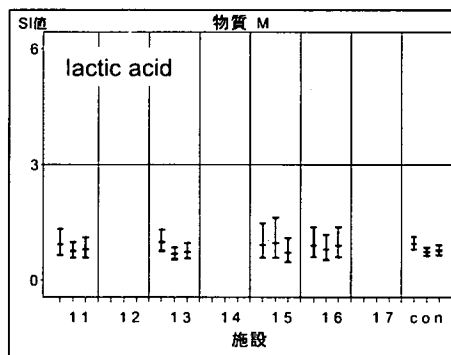
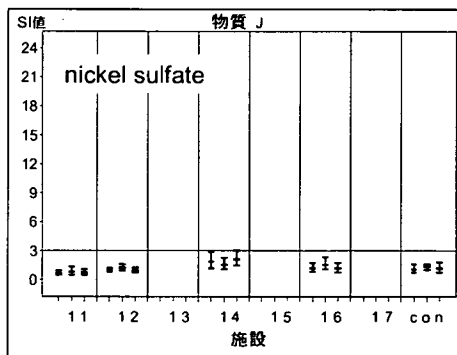
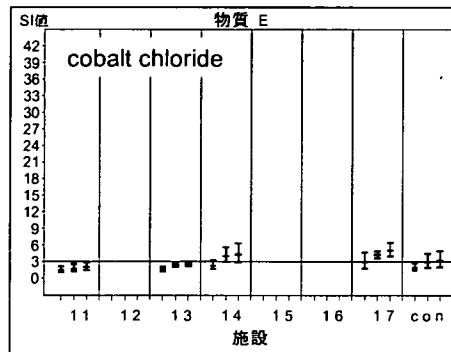
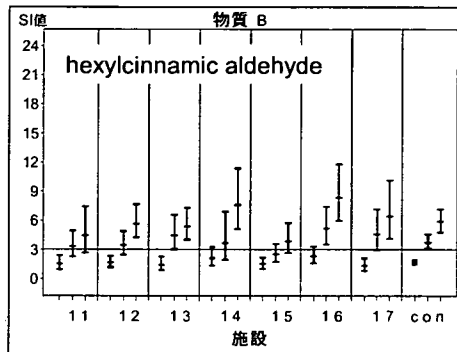


図 3.6.1 SI 値の用量反応関係

3.7 施設間の再現性

施設間再現性は、 $\exp(\tau^2)$ に基づき評価した。各被験物質のSI値（図 3.6.1）から計算した $\exp(\tau^2)$ の値と重み付き平均、その95%信頼区間を表 3.7.1 に示す。

$\exp(\tau^2)$ の値がいくらであれば施設間差が大きいと判断するというような基準値は特にないが、以前の研究（第 1 実験）の結果からは 1.2 より小さい場合にはばらつきは小さく、施設間差は大きくはないといえるであろうと考察した。ここではの結果は、全 5 物質でのすべての濃度で 1.2 より小さな値となった。つまり、きわめて小さな施設間変動であったといえるであろう。

表 3.7.1 各被験物質のばらつきの指標施設間分散の値

被験物質	低濃度			中濃度			高濃度		
	SI値	95%信頼区間	$\exp(\tau^2)$	SI値	95%信頼区間	$\exp(\tau^2)$	SI値	95%信頼区間	$\exp(\tau^2)$
B: hexylcinnamic aldehyde	1.68	(1.44 , 1.95)	1.00	3.77	(3.08 , 4.60)	1.03	5.87	(4.82 , 7.15)	1.03
E: cobalt chloride	1.97	(1.48 , 2.62)	1.05	2.97	(1.98 , 4.48)	1.17	3.23	(2.11 , 4.93)	1.18
J: nickel sulfate	1.07	(0.72 , 1.61)	1.15	1.29	(1.02 , 1.64)	1.03	1.16	(0.75 , 1.80)	1.18
M: lactic acid	0.95	(0.79 , 1.14)	1.00	0.74	(0.64 , 0.85)	1.00	0.78	(0.65 , 0.93)	1.00
N: potassium dichromate	2.29	(1.75 , 3.01)	1.06	3.28	(2.23 , 4.81)	1.14	5.05	(4.06 , 6.27)	1.04

参考として、いずれかの濃度でSI値が3を超えた場合を陽性、そうでない場合を陰性とした場合の各施設の判定結果を表 3.7.2 に示す。

施設によって異なる判定がされたのは、被験物質 E (cobalt chloride) のみであった。

表 3.7.2 各施設での個々の物質の判定結果

被験物質	感作性*		施設							溶媒	
			11	12	13	14	15	16	17		
B: hexylcinnamic aldehyde	+	Moderate	+	+	+	+	+	+	+	+	AOO
E: cobalt chloride	+	Strong	-		-	+				+	DMSO
J: nickel sulfate	-	Negative	-	-		-		-	-		DMSO
M: lactic acid	-	Negative	-		-		-	-			DMSO
N: potassium dichromate	+	Strong	+	+				+		+	DMSO

*:LLNA法の評価結果に基づく感作性の判定

3.8 施設内の再現性

各施設の各実験から得られた陽性対照の SI 値 (図 3.5.2) について, 施設ごとに重み付き平均による SI 値とその 95%信頼区間および $\exp(\tau^2)$ を計算した結果を表 3.8.1 に示す. この計算には予備実験の陽性対照は含めていない.

図 3.5.2 からわかるように陽性対照物質の $\exp(\tau^2)$ はすべての施設で最小値である 1 に近い値であった.

表 3.8.1 陽性対照による施設内再現性

施設	SI値	95%信頼区間	$\exp(\tau^2)$
11	3.94	(3.16 , 4.92)	1.00
12	4.89	(3.86 , 6.19)	1.00
13	5.71	(4.17 , 7.81)	1.03
14	6.78	(5.52 , 8.33)	1.00
15	4.34	(3.44 , 5.47)	1.00
16	7.10	(6.16 , 8.19)	1.00
17	7.83	(5.72 , 10.73)	1.00

3.9 一定の基準を満たす施設の選定と実施のしやすさ

3.9.1 提案施設の背景データ

提案施設による 5 回の実験による得られた 25% hexylcinnamic aldehyde の ATP 発光量比とその範囲を表 3.9.1 に示す。

この表の下段に記載したように ATP 発光量比の範囲の平均値は 2.65 となった。この値にもとづき計算した検出限界の値は 4.91 となった。

表 3.9.1 提案施設の 25% hexylcinnamic aldehyde の ATP 発光量比と範囲

実験番号	ATP発光量比	範囲
1	5.26	2.30
	6.49	
	4.18	
	4.92	
2	6.49	2.15
	4.71	
	4.76	
	6.86	
3	8.09	3.14
	8.33	
	6.58	
	5.20	
4	7.10	2.76
	4.34	
	5.61	
	6.73	
5	7.09	2.89
	5.70	
	4.20	
	6.15	
平均値		2.65
検出限界		4.91

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

各実験実施施設の各実験における 25% hexylcinnamic aldehyde の ATP 発光量比の範囲を表 3.9.2 に示す。この表の実験番号 2 は被験物質としての実験結果、実験番号 1 は、実験番号 2 の実験時の陽性対照として得られた実験結果である。実験番号 3 と 4 は 25% hexylcinnamic aldehyde 以外の物質の実験時の陽性対照として得られた実験結果である。

どの施設においても実験番号 1 と 2 の ATP 発光量比の範囲の値は検出限界の値 4.91 を超えていないので、7 施設すべてが一定の基準を満たしているという結果となった。

表 3.9.2 各実験実施施設の 25% hexylcinnamic aldehyde の ATP 発光量比の範囲

施設	実験番号	ATP発光量比の範囲
11	1	1.89
	2	3.29
	3	1.51
	4	2.19
12	1	4.55
	2	1.50
	3	2.27
13	1	2.45
	2	1.94
	3	1.00
14	1	1.34
	2	3.86
	3	4.02
15	1	2.49
	2	1.83
	3	1.67
16	1	4.38
	2	2.94
	3	0.67
17	1	3.47
	2	2.86
	3	1.86

3.9.3 実施しやすさの検討結果

表 3.9.3 に、25% hexylcinnamic aldehyde の ATP 発光量比における、提案施設を含めない実験実施施設の施設間分散、実験実施施設の実験間分散、実験内分散の分散、およびそれらから計算される兵頭の r の値を示す。兵頭の r の値は 0.4 であり、施設間差は、実験内のばらつきに比べてそれほど大きくはなっていない。よって、LLNA-DA 法が実施しやすい方法であるといえるであろう。

表 3.9.3 兵頭の r

施設間分散 (提案施設を除く)	実験間分散	実験内分散	兵頭の r
1.76	0.97	1.62	0.4

4 考察

4.1 本研究の位置づけと意義

本研究の位置付け

第2実験では、第1実験で明確にはできなかった2つの点に関して検討を行った。1つは一定の基準をみたす施設の判定法の構築と構築された基準に基づき一定とみなされた施設での施設間再現性の評価であり、2つめは LLNA-DA 法の金属アレルギーへの適用の可能性、DMSO を溶媒とする被験物質へのさらなる情報の収集である。

第1点目については、提案施設の25% hexylcinnamic aldehyde の背景データを利用して、実験内における測定値のばらつきの範囲を構成し、個々の施設での同じ物質のデータが、この範囲の中に入れば一定の基準を満たすことにした。この方法を適用した結果、第2実験で実験を実施した全7施設が基準を満たすことになった。この点については、SOP の記載が実験者にとって適切に実験を行うのに十分であったという以外に、技術研修を適切に実施したことや予備実験によりデータを確認したことが大きいと考えられる。

第2点目については、第1実験で施設間差の大きかった2つの金属塩(被験物質 E (cobalt chloride) と J(nickel sulfate)) と第2実験で追加された金属塩である被験物質 N (potassium dichromate) の SI 値はいずれも施設間のばらつきは小さく、LLNA-DA 法は金属塩についても適用が可能であることを示したといえる。さらに、上記3物質と被験物質 M (lactic acid) はいずれも溶媒として DMSO が使用され、これら4物質のすべてで施設間再現性は高かったために、投与時に注意すれば DMSO を溶媒として利用できることを示した。

本研究の特徴的な点

バリデーション研究では、transferability はひとつの基準となっているものの、transferability を定量的な評価するための具体的な方法論は十分に用意されてこなかった。この第2実験では、その方法論の構築を行うとともに具体的に適用した。

第2実験のもうひとつの特徴は、第1実験とは異なる7施設が実験を実施したことである。第1実験で用いられた共通物質のひとつであり陽性対照物質でもある hexylcinnamic aldehyde を第2実験でも共通物質とすることで、この物質を通して、第1実験と第2実験の乖離について知ることができるように設定した。このことにより hexylcinnamic aldehyde に関して、全17実験実施施設からの実験データが得られている。

また、溶媒が DMSO である 4 物質を用いて実験を行ったため、第 1 実験では不十分であった DMSO の ATP 発光量やリンパ節重量のデータが収集できた。

4.2 本研究で評価した LLNA-DA 法の操作上的特徴

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

第 2 実験では、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 の被験物質リスト（資料 3）の中から 5 被験物質を選択した。

選択の基準は、第 1 実験で共通物質であり陽性対照物質である被験物質 B (hexylcinnamic aldehyde) を選択すること、被験物質 E (cobalt chloride) と J(nickel sulfate)と DMSO を溶媒とする他の 2 物質を選ぶこととされた。なお、遮蔽している物質が明らかになる可能性を大きくしないために、この基準は実験実施者には知らせなかった。

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、5 被験物質の感作性の内訳は、無が 2 物質、弱が 1 物質、強が 2 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、第2実験は第1実験と同様に、完全な good laboratory practice (GLP) に対応した実験を求めることまではできていない。しかし、データの質を担保するために以下に記載する配慮を行った。

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が実施され、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に正しく記録されているかどうかを確認するために、実験中にデータシートのプリントアウトに記録された ATP 発光量の値と入力されたファイルでの値の整合性の確認を行った。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。

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% hexylcinnamic aldehyde 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。すべての施設のすべての実験結果で陽性対照群での SI 値は基準値である 3 を超えていた（図 3.5.2）。

第2実験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 1.03 の範囲であった（表 3.8.1）。この結果は第1実験の結果とほぼ同等であった。

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

5 物質中 7 施設で実験を行った物質 B (hexylcinnamic aldehyde) 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。

4 施設で実験を行った残り 4 物質のうち、被験物質 J (nickel sulfate), N (potassium dichromate), M (lactic acid) では、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。

被験物質 E (cobalt chloride) は、SI 値に基づく感作性の判定では施設間差が生じたが、用量反応関係に関しては高い施設間再現性であった。この物質の高濃度での 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高濃度以上での実験は

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は用量反応がみられ高濃度で 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。

4.3.5 LLNA-DA 法の実施のしやすさ

第 2 実験では、施設が一定の基準をみたすかどうかの検討、そして、試験法が実施のしやすい試験法であるのかの検討を行った。この結果、全 7 実験実施施設が一定の基準を満たした。また、LLNA-DA 法は実施のしやすい試験法であるということが定量的に示された。この結果は、おそらく技術移転の実施によるところが大きいと考えられる。技術移転の実施により、文書化された SOP を読むだけでは理解できない実験の詳細な点を把握するだけでなく、施設間で異なっていた細かい実験技術を共有化することができたと考えられる。技術研修を行わなかった場合にどのような結果になるのかはこの研究からは知ることができない。よって、新たに LLNA-DA 法を導入する場合、可能な限り提案施設等の LLNA-DA 法の実験操作に関して豊富な経験をもつ施設から技術研修を受けるなどし、適切な実験方法の習得に努めることを推奨する。

4.3.6 個々の被験物質に対する考察

被験物質 B (hexylcinnamic aldehyde) は、割付に考慮した分類に基づくと弱 (moderate) に分類される。結果は 7 施設のすべてで陽性と判定された。

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。この物質は第 1 実験で報告された濃度よりも高い濃度での実験が行われたが、4 施設中 2 施設は陰性と判定した。しかしながら、高用量 (5%) での SI 値はそれぞれ 2.01, 2.54, 4.25, 5.06 であり、ばらつきは小さく、いずれも施設も濃度の増加とともに SI 値は増加した。

被験物質 J (nickel sulfate) は、割付に考慮した分類に基づくと無 (negative) に分類されるが、この物質は感作性物質であり、LLNA 法では検出できない物質として知られている。第 1 実験のときには大きかった施設間差は小さくなり、4 施設ともに陰性と判定し、用量反応関係はみられなかった。

被験物質 M (lactic acid) は、割付に考慮した分類に基づくと無 (negative) に分類される。4 施設ともに陰性と判定し、用量反応関係はみられなかった。

被験物質 N (potassium dichromate) は、割付に考慮した分類に基づくと強 (strong) に分類される。4 施設ともに陽性と判定し、用量反応関係がみられた。高用量 (1%) での SI 値はそれぞれ 4.78, 4.08, 6.01, 6.37 であった。

4.4 第1実験から得られた結果を含めての考察

本研究では、3物質について第1実験と同じ物質を用いている。ここでは第1実験報告書で提示された結果とこの報告書で報告された結果を再度示し、2つの研究結果の考察を示す。

4.4.1 溶媒のATP発光量とリンパ節重量

第1実験と第2実験ともに、1回の実験で2もしくは3被験物質の適用した。このことにより、同じ実験内での溶媒は同じものとなっている。

第1実験と第2実験で用いられた溶媒は、AOO, ACE, DMSOの3種類である。全17施設から得られたAOO, ACE, DMSOのATP発光量の平均値と標準偏差をそれぞれ表4.4.1, 表4.4.2, 表4.4.3に、リンパ節重量の平均値と標準偏差をそれぞれ表4.4.4, 表4.4.5, 表4.4.6に示す。これらの表の下段は、同時に実験された被験物質のコードを示している。これらのデータは、今後LLNA-DA法を使用する施設にとって、背景データを考える上で有用な情報となるであろう。

表 4.4.1 被験物質別の AOO の ATP 発光量

施設														
1			2			3			4			5		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	27188	10027	4	26159	2157	4	35610	7212	4	42866	9956	4	11899	7366
A, C, H			A, K			A, H			A, F			A, F		
4	24583	5761	4	41189	17452	4	35652	12253	4	43007	8931	4	19146	6582
B, I			B, I			B, I			B, I			B, I		
12	23639	5906	12	30284	11576	4	24047	3932	12	44371	9224	12	15183	5554
PC			PC			C, L			PC			PC		
						12	25429	5894						
						PC								

施設														
6			7			8			9			10		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	13910	3921	4	22466	3515	4	20576	5546	4	26842	9515	4	53350	14893
A, K			A, H			A, C			A, F			A, L		
4	16375	3953	4	29925	6142	4	12207	4127	4	29602	8049	4	29077	2876
B, I			B, I			B, I			B, I			B, I		
12	10447	4413	4	21546	13493	12	18428	4502.7	8	26327	5483.5	8	22309	6393
PC			K, L			PC			PC			PC		
			12	25112	8035									
			PC											

施設														
11			12			13			14			15		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	21328	8537	4	27436	7629	4	24739	6350	4	24348	8236	4	31189	10511
B			B			B			B			B		
12	25807	8795	8	30147	6951	8	24943	6509	8	27245	7022	8	33713	7937
PC			PC			PC			PC			PC		

表 4.4.1 被験物質別の AOO の ATP 発光量 (つづき)

施設					
16			17		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	28421	8943	4	23888	10275
B			B		
8	37383	5294	8	17417	7195
PC			PC		

表 4.4.2 被験物質別の ACE の ATP 発光量

施設								
1			2			5		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	17947	4929	4	38044	13217	4	16439	6488
D, G			D, G			D, G		

表 4.4.3 被験物質別の DMSO の ATP 発光量

施設								
4			6			8		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	100396	24632	4	4184	2395	4	19803	4451
E, J			E, J			E, J		

施設														
11			12			13			14			15		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	82093	26296	4	83046	6308	4	81326	13350	4	41770	12971	4	49353	21291
E, J			J, N			E, M			E, J			M, N		
4	65060	9211												
M, N														

施設					
16			17		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	76153	28228	4	50815	5671
J, M			E, N		

表 4.4.4 被験物質別の AOO のリンパ節重量

施設														
1			2			3			4			5		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	4.3	0.7	4	3.3	0.3	4	4.6	0.6	4	4.8	0.4	4	2.9	0.9
A, C, H			A, K			A, H			A, F			A, F		
4	3.9	0.5	4	3.8	0.7	4	4.3	0.6	4	4.7	0.4	4	4.5	0.7
B, I			B, I			B, I			B, I			B, I		
12	3.8	0.4	12	3.8	0.8	4	4.0	0.4	12	5.0	0.6	12	3.8	1.1
PC			PC			C, L			PC			PC		
						12	4.4	0.5						
						PC								

施設														
6			7			8			9			10		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	4.4	0.4	4	3.4	0.6	4	3.3	0.6	4	5.0	0.4	4	7.4	1.0
A, K			A, H			A, C			A, F			A, L		
4	4	0.2	4	3.7	0.6	4	2.4	0.5	4	5.3	0.8	4	5.3	0.6
B, I			B, I			B, I			B, I			B, I		
12	3.6	0.5	4	3.8	1.0	12	3.5	0.5	8	4.9	0.5	8	5.0	2.1
PC			K, L			PC			PC			PC		
						12	3.9	1.1						
						PC								

施設														
11			12			13			14			15		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	5.1	0.5	4	4.4	0.3	4	3.6	0.3	4	3.4	0.5	4	4.1	1.0
B			B			B			B			B		
12	5.3	1.0	8	4.9	0.6	8	3.7	0.4	8	3.7	0.5	8	4.1	0.6
PC			PC			PC			PC			PC		

施設					
16			17		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	4.2	0.6	4	3.1	0.6
B			B		
8	4.2	0.5	8	2.6	0.8
PC			PC		

表 4.4.5 被験物質別の ACE のリンパ節重量

施設								
1			2			5		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	3.4	0.4	4	4.6	0.7	4	3.7	0.6
D, G			D, G			D, G		

表 4.4.6 被験物質別の DMSO のリンパ節重量

施設								
4			6			8		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	6.8	1.1	4	3.5	0.2	4	3.8	0.6
E, J			E, J			E, J		

施設												
11			12			13		14		15		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	
4	9.2	2.2	4	7.4	0.8	4	7.7	1.0	4	4.9	1.3	
E, J			J, N			E, M		E, J		M, N		
4	8.1	0.7										
M, N												

施設					
16			17		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	5.9	1.1	4	5.1	0.3
J, M			E, N		

第 1 実験の報告書で考察したように、DMSO の ATP 発光量のばらつきは、第 1 実験における 3 施設（施設 4, 6, 8）間で約 4,000 から 100,000 の値を取り、乖離が大きい。DMSO は AOO や ACE に比べて塗布が困難であり、施設によっては十分に塗布が行えなかったことがこのようなばらつきの原因になったと考えられる。この反省に基づき、第 2 実験の技術研修では、DMSO の塗布操作が加えられた。第 2 実験での DMSO の ATP 発光量のばらつきは、約 49,000 から 85,000 程度であり、施設間のばらつきは小さいものとなった。溶媒に DMSO を用いる場合、他の溶媒に比べて塗布操作は注意すべきであろう。

また、AOO や ACE に比べて、DMSO の ATP 発光量、リンパ節重量は大きな値をとっている。このことから、溶媒である DMSO そのものがリンパ節増殖能を有していると考えられる。同様な傾向は、いくつかの LLNA の報告でもみられる（例えば Ryan ら (2002), Warbrick ら(1999), Wright ら (2001)）。溶媒群の ATP 発光量が大きな傾向になることは、SI 値を相対的に小さくするであろうから、用いる溶媒によって、SI 値の大きさが多少変化するであろうことが示唆される。特に溶媒として DMSO を用いた場合には、溶媒群における ATP 発光量が大きくなる傾向があることは意識しておくべきであろう。

4.4.2 物質B : hexylcinnamic aldehyde

陽性対照物質でもある hexylcinnamic aldehyde は、第1実験、第2実験の共通物質でもあった。したがって、すべての実験実施施設がこの物質の実験を行ったことになる。

第1実験、第2実験の遮蔽下での hexylcinnamic aldehyde の用量反応関係を図4.4.1に示す。

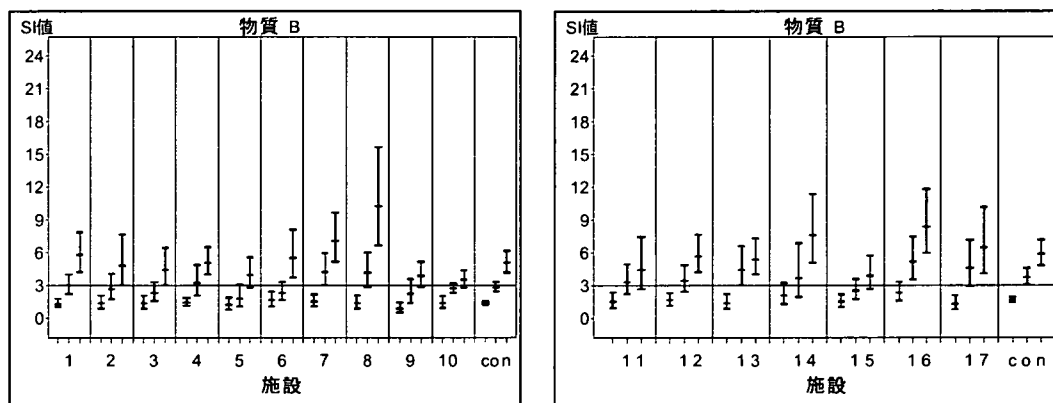


図4.4.1 hexylcinnamic aldehyde の用量反応関係 (全17施設)

図4.4.1より、この物質について、第1実験と第2実験の間の差はないといえる。また、全17施設の施設間差もきわめて小さいことがわかる。

4.3.3 物質 E : cobalt chloride と物質 J : nickel sulfate

第 2 実験の目的のひとつは、第 1 実験のみでは結論を得ることが困難であった物質 E (cobalt chloride) と物質 J (nickel sulfate) の追加検討であった。

図 4.4.2 と図 4.4.3 に物質 E (cobalt chloride) と物質 J (nickel sulfate) の用量反応関係を示す。

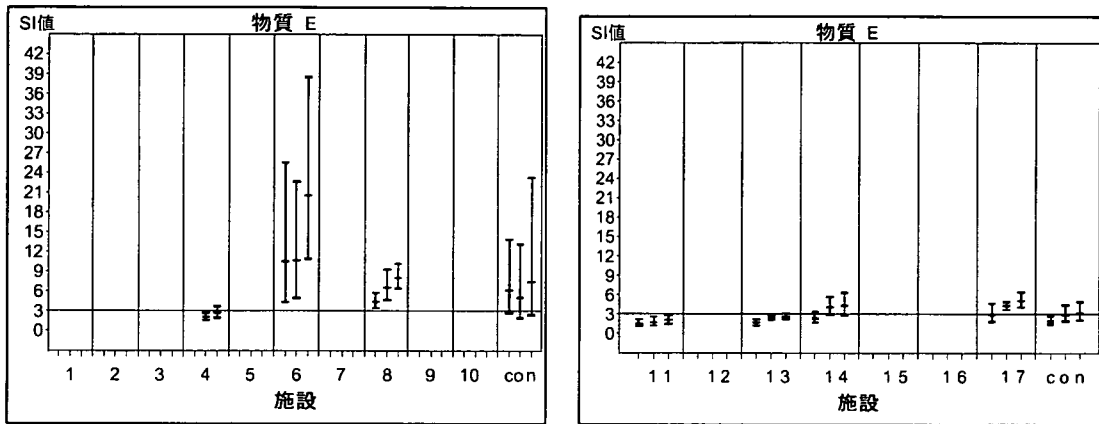


図 4.4.2 cobalt chloride の用量反応関係

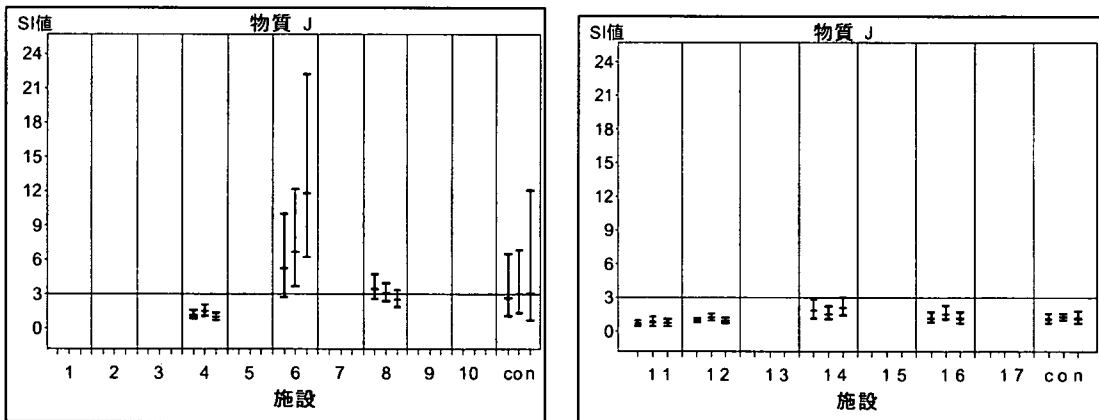


図 4.4.3 nickel sulfate の用量反応関係

これらの図から、明らかのように第 1 実験でみられた大きな施設間差は第 2 実験ではみられなかった。この 2 つ物質の溶媒は DMSO であり、4.4.1 で示したように第 1 実験とは異なり第 2 実験での DMSO の ATP 発光量の施設間差が小さかったことが、この SI 値のばらつきが小さい結果を導いたと考えられる。

4.5 本研究の限界と今後の課題

本研究にも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。

被験物質数について

本研究の結果、LLNA-DA 法は良好な施設間再現性を示した。しかしながら、第 2 実験で用いた被験物質数はわずか 5 物質のみであり、第 1 実験とあわせても 14 物質である。今後は、提案施設を中心に、より多くの物質での実験を行った結果が必要であろう。

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していない。

また、ATP の測定器はすべての施設で同一の機器（キッコーマン、LUMITESTER C-100）を用いた。測定器の違いが結果に与える影響は評価できていない。この点は本研究の範囲外である。

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 5 物質を用いて 7 実験実施施設による施設バリデーション研究を実施した。7 施設すべてが、この研究を通して考案された試験法の実施のしやすさの基準に適合し、一定の基準を満たす施設と判定された。5 物質の結果はいずれも高い施設間再現性を示した。これらの結果から LLNA-DA 法は実施しやすい試験法であると考えられる。

被験物質として金属塩をふくめることによって LLNA-DA 法は金属塩にも使用可能であることを確認した。溶媒として DMSO を用いることができるが、その場合には十分に塗布操作に注意する必要がある。また、DMSO そのものがリンパ節増殖能を有する可能性があることにも注意すべきである。

良好な施設間再現性は技術研修を行ったことに依存していると考えられるため、新たに LLNA-DA 法を導入する施設は十分かつ適切な実験方法の習得を行うべきである。

謝辞

本研究は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。

中村未央(株式会社薬物安全性試験センター), 萩原沙織(株式会社薬物安全性試験センター), 森光二(トーアエイヨー株式会社), 高野奈緒美(トーアエイヨー株式会社), 片倉由紀子(トーアエイヨー株式会社), 宮坂純子(ピアス株式会社), 高木裕美(ピアス株式会社), 判治貴之(ピアス株式会社), 西村郁美(日本新薬株式会社), 蛭田仁(日本新薬株式会社), 中村愛(参天製薬株式会社), 神尾一三(参天製薬株式会社), 廣井聡(参天製薬株式会社), 中村伸昭(ホーユー株式会社), 永池美香(石原産業株式会社), 乾公正(石原産業株式会社)

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.