

- 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.
- Ryan, C. A., Cruse, L. W., Skinner, R. A., Dearman, R. J., Kimber, I. and Gerberick, G. F. (2002) Examination of a vehicle for use with water soluble materials in the murine local lymph node assay. *Food and Chemical Toxicology* 40, 1719–1725.
- 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.
- Warbrick, E. V., Dearman, R. J., Basketter, D. A. and Kimber, I. (1999) Influence of application vehicle on skin sensitization to methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone: an analysis using the local lymph node assay. *Contact Dermatitis* 41, 325–329.
- Wright, Z. M., Basketter, D. A., Blaikie, L., Cooper, K. J., Warbrick, E. V., Dearman, R. J. and Kimber, I. (2001) *International Journal of Cosmetic Science* 23, 75–83.
- 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.
- 兵頭洋平 (2007) 「動物実験代替法のバリデーションにおける transferability の統計的評価方法に関する研究」東京理科大学工学研究科工学修士学位請求論文 2006 年度 (平成 18 年度) .
- 三浦新, 今泉益正 (1968) 管理図. 日本規格協会.

LLNA-DA法バリデーション研究 結果報告

バリデーション委員会委員長、
LLNA-DA法バリデーション研究実行委員長

2007年8月1日(配布版)

大森 崇

1

皮膚刺激性判定の指標

○ SI値 > 3ならば陽性; そうでなければ陰性

$$\text{SI値} = \frac{\text{被験物質の
ある用量群での
平均ATP発光量}}{\text{被験物質に対応した
溶媒群での
平均ATP発光量}}$$

2

経緯

- 評価委員会の評価結果
 - バリデーション研究が必要
「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)の一次
評価報告書」
- バリデーション委員会主導で、
実行委員会を組織
バリデーション研究を実施

3

公募とグループ分け

- 参加施設の公募
 - 19実験施設が参加を希望
 - 動物の手配、測定器の関係から
全体を2つのグループに分ける
- 実験施設のグループ分け
 - 第1グループ 10施設
 - 第2グループ 9施設
(実際には7施設が実験実施)

4

研究組織と役割

- 実行委員会
 - 実行委員長、被験物質選定担当者、技術研修担当者、被験物質割付担当者、動物・測定機器手配担当者、試料等手配担当者、バリデーション委員
実験参加施設代表者、データ解析担当者
- その他
 - 実験責任者、実験担当者

5

当初の予定

- 両グループとも施設間再現性を検討
- 第1グループが先行して研究を実施
- 課題が生じた場合には、その課題を解決することも第2グループの研究で

6

時間経過 第1グループの研究

- 2006年1月 公募
- 2月 第1回実行委員会(2/6)、
測定器校正、技術研修、予備実験
- 3月 第2回実行委員会(3/27)
- 4月 計画書・SOP固定、実験開始
- 7月 データ解析
- 8月 第3回実行委員会(8/21)
- 12月 マスク下での報告書提出

7

時間経過 第2グループの研究

- 2006年1月 公募
- 8月 第3回実行委員会(8/21)
- 10月 測定器校正、技術研修、予備実験
- 11月 第4回実行委員会(11/27)
- 12月 実験開始
- 2007年3月 データ解析、マスク開示、
第5回実行委員会(3/16)
- 6月 2つの研究の報告書提出

8

評価委員会からのコメント

1) Core laboratoryはダイセル化学に努めてもらい、プロトコルを作成してもらおう。また、技術トランスファーを実施してもらおう。

- ダイセル化学工業(株)が原案(プロトコル)を作成
- 実行委員会で検討し、最終版(SOP)を作成

9

評価委員会からのコメント

2)バリデーションに協力してもらおう機関はLLNA法を行ったことがあり、ATP測定装置を有する機関とするのが良い。

- 第1グループの全実験実施施設はLLNA法かそれに準じた方法の経験施設
- ATP測定装置は借りたため、すべての施設が同じものを使用

10

評価委員会からのコメント

3) 試験期間を1月程度としたとき、1機関で実施可能な被験物質数はプロトコルの内容によって異なるが、陽性対照、陰性対照、被験物質2個(1用量)を1セットとした場合、1週間で実施可能であることから、これを3回繰り返すとして、6検体まで可能であろう。

- 1施設3～7物質
- 全部で14物質を実施

11

評価委員会からのコメント

4) 1群当りの動物数はLLNA-DA法では3匹であるが、LLNA-DA法はLLNA法よりも動物数を減らす事を主眼とした代替法ではないこと、また、3匹では1匹分のデータが使用不能になった場合に解釈が困難になることから、LLNA法に準じて4匹が良い。

- 1群あたり4匹で実施

12

評価委員会からのコメント

5) 用量段階は、公比10、3用量で行うのが良い。

- 用量は物質ごとに決定
 - LLNAの報告にもとづき、陽性の場合に3用量でSI値が3をまたぐであろうと思われる用量を設定
- 用量を固定して実験実施施設に配布

13

評価委員会からのコメント

6) 被験物質候補リストはダイセル化学工業(株)の協力を得て作成する。

- ダイセル化学の協力を得てリストを作成
- 最終的な決定は実験実施施設とは独立な被験物質選定者

14

評価委員会からのコメント

7)初めはバイアスがなるべく少なくなるように、条件を揃えて実施するのが良い。

- 用量を固定
- 物質をマスク化
- ATP測定器の統一、校正の実施
- 実行委員によるSOPの固定
- 技術研修会の実施
- 予備実験の実施と確認

15

第1実験

重要な資料

- 研究計画書【別添1】
 - 研究の背景、目的を記載
- SOP【資料5】
 - LLNA-DA法の実験手順書
- 被験物質のリスト【資料3】
 - 研究前に選択された被験物質の候補

16

第1実験

研究目的

- 施設間再現性の検討
- 代替可能性の検討

17

第2実験

第1実験のまとめ

- 12物質中10物質で良好な施設間再現性
- E(Cobalt chloride)とJ(Nickel sulfate)は大きな施設間差
 - 2つとも金属で溶媒はDMSO
- GPMT/BTに対して良好な妥当性
 - LLNA法と同程度の性能

18

第2実験

重要な資料

- 研究計画書【資料6】
 - 研究の背景、目的を記載
- SOP【資料7】
 - LLNA-DA法の実験手順書
- 被験物質のリスト【資料3】
 - 研究前に選択された被験物質の候補

19

第2実験

研究目的

- (Transferabilityの検討)
 - 一定の基準を満たす施設の選定
 - 選定された施設を用いた施設間再現性
- DMSOを溶媒とした金属の追加検討

20

第2実験

第2実験のまとめ

- (すべての施設が一定の基準を満たす)
 - 実験条件の統一、技術研修の成果
 - LLNA-DA法は頑健な試験法
- 5物質で良好な施設間再現性
 - DMSOの塗布には注意が必要

21

バリデーション研究のまとめ

- 2つのバリデーション研究で
17施設で14物質を評価
- 良好な施設間再現性と妥当性

研究結果は、LLNA-DA法が
LLNA法と同様な性能であることの
十分なエビデンスを示した

22



確認事項

- 今後の予定についてお教えてください
 - 評価プロセス中のやりとり
 - 評価結果の報告を受ける主体者

2007年 11月8日

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

【背景】

2004年1月15日に提出した「代替試験法申請書類 皮膚感作性試験：LLNA-DA法」では、資料6：LLNA-DA試験結果において、17物質の評価結果を提示した。その後行われた評価委員会では、陰性の物質が少なかったことが指摘され、一次評価報告書では、施設内バリデーションでの被験物質の選択はほぼ適切であるが、陰性物質を含めたより多くの被験物質での追加検討の必要であるとされている。

LLNA-DA法バリデーション実行委員会により実施された多施設間バリデーション研究では、第1実験、第2実験を通じて14物質が評価された。

これと平行し、弊社では一般に良く知られた物質で、LLNAやGPMT、ヒトでの皮膚感作性試験等による結果が報告されているものについて評価を継続して実施してきた。

施設内バリデーションの結果として、計31物質の評価結果を提示する。

【結果の要約】

評価した31物質を表1に纏めた。内17物質は既に「代替試験法申請書類 皮膚感作性試験：LLNA-DA法」で提示したものである。

弊社において実施した31物質のLLNA-DA法による試験結果を表2に纏めた。31物質中、22物質が陽性、9物質が陰性であった。

LLNA-DA法による試験結果のまとめと、他の試験法による結果との比較を表3に纏めた。

31物質の評価結果に基づき、LLNA-DA法の感度、特異度、予測性、一致率を、表4-1、4-2、4-3に纏めた。LLNAの結果に対する一致率は93% ($\kappa=0.850$)、GPMT/BAの結果に対する一致率は80% ($\kappa=0.525$)、HMT/HPTAの結果に対する一致率は79% ($\kappa=0.377$)であった。

以上

LLNA: local lymph node assay

GPMT: guinea pig maximization test

BA: Buehler assay

HMT: human maximization test

HPTA: human patch test allergen.

表1 被験物質リスト

被験物質名		CAS RN
2,4-Dinitrochlorobenzene	DNCB	97-00-7
<i>p</i> -Phenylenediamine		106-50-3
Tolylene-2,4-diisocyanate	TDI	584-84-9
Glutaraldehyde		111-30-8
Potassium dichromate	K ₂ Cr ₂ O ₇	7778-50-9
Pthalic anhydride		85-44-9
Trimellitic anhydride	TMA	552-30-7
Formaldehyde		50-00-0
Cinnamic aldehyde		104-55-2
Isoeugenol		97-54-1
Cobalt (II) chloride	CoCl ₂	7646-79-9
Eugenol		97-53-0
Resorcinol		108-46-3
Benzocaine		94-09-7
Abietic acid		514-10-3
Hexylcinnamic aldehyde	HCA	101-86-0
Mercaptobenzothiazol		149-30-4
Citral		5392-40-5
Hydroxycitronellal		107-75-5
Imidazolidinyl urea		39236-46-9
Sodium lauryl sulfate	SLS	151-21-3
Nickel (II) sulfate hexahydrate	NiSO ₄	10101-97-0
Benzalkonium chloride		8001-54-5
Propyl 4-hydroxybenzoate	Propyl paraben	94-13-3
Diethylphthalate		84-66-2
1-Bromobutane		109-65-9
Methysalicylate		119-36-8
Chlorobenzene		108-90-7
Lactic acid		50-21-5
Hexane		110-54-3
Isopropanol	IPA	67-63-0

表2 LLNA-DA法による31物質の評価データ

Chemicals	Vehicle	%	Lymph node weight(mg)			ATP content(RLU)			EC3
			Average ± S. E.	SI	± S. E.	Average ± S. E.	SI	± S. E.	
DNCB	AOO	0	3.35 ± 0.63	1.00 ± 0.19	-	2975 ± 1315	1.00 ± 0.44	-	0.05
		0.05	6.88 ± 0.16	2.05 ± 0.05	**	8903 ± 1444	2.99 ± 0.49	*	
		0.1	8.05 ± 0.53	2.40 ± 0.16	**	9541 ± 2709	3.21 ± 0.91	*	
		0.25	19.65 ± 1.98	5.86 ± 0.59	**	25618 ± 7677	8.61 ± 2.58	*	
		0.5	26.11 ± 1.97	7.79 ± 0.59	**	36673 ± 7175	12.33 ± 2.41	**	
		1	32.83 ± 1.20	9.79 ± 0.36	**	36682 ± 3410	12.33 ± 1.15	**	
p-Phenylenediamine	AOO	0	4.14 ± 0.64	1.00 ± 0.16	-	2894 ± 827	1.00 ± 0.29	-	0.07
		0.1	7.15 ± 0.78	1.73 ± 0.19	**	10302 ± 1449	3.56 ± 0.50	**	
		0.25	9.81 ± 1.02	2.37 ± 0.25	**	14864 ± 1916	5.14 ± 0.66	**	
		0.5	8.51 ± 1.40	2.06 ± 0.34	**	12115 ± 3028	4.19 ± 1.05	**	
		1	8.09 ± 0.81	1.96 ± 0.20	**	9085 ± 2222	3.14 ± 0.77	**	
Tolylene diisocyanate	AOO	0	4.07 ± 0.15	1.00 ± 0.04	-	2818 ± 491	1.00 ± 0.17	-	0.05
		0.05	8.43 ± 1.36	2.07 ± 0.34	*	8972 ± 2259	3.18 ± 0.80	*	
		0.1	11.97 ± 1.05	2.94 ± 0.26	**	15632 ± 2173	5.55 ± 0.77	*	
		0.25	18.90 ± 2.05	4.65 ± 0.51	**	27393 ± 2161	9.72 ± 0.77	**	
Glutaraldehyde	ACE	0	3.48 ± 0.31	1.00 ± 0.09	-	1611 ± 367	1.00 ± 0.23	-	0.10
		0.05	3.57 ± 0.21	1.03 ± 0.06	-	1978 ± 151	1.23 ± 0.09	-	
		0.1	5.50 ± 1.05	1.58 ± 0.30	*	4743 ± 1636	2.94 ± 1.02	*	
		0.25	7.87 ± 1.71	2.26 ± 0.49	**	10396 ± 4328	6.45 ± 2.69	**	
K2Cr2O7	DMSO	0	6.92 ± 0.94	1.00 ± 0.14	-	64899 ± 16192	1.00 ± 0.25	-	0.14
		0.1	12.48 ± 1.20	1.80 ± 0.17	**	167954 ± 22252	2.59 ± 0.34	**	
		0.3	17.06 ± 1.57	2.46 ± 0.23	**	289546 ± 79591	4.46 ± 1.23	**	
		1	22.56 ± 3.90	3.26 ± 0.56	**	356437 ± 63595	5.49 ± 0.98	**	
Trimellitic anhydride	AOO	0	3.48 ± 0.44	1.00 ± 0.13	-	3362 ± 638	1.00 ± 0.19	-	0.17
		0.1	5.76 ± 0.81	1.65 ± 0.23	*	8272 ± 2311	2.46 ± 0.69	*	
		0.25	6.81 ± 0.46	1.96 ± 0.13	**	12045 ± 1319	3.58 ± 0.39	*	
		0.5	9.15 ± 0.96	2.63 ± 0.28	**	16670 ± 1884	4.96 ± 0.56	**	
Pthalic anhydride	AOO	0	3.48 ± 0.44	1.00 ± 0.13	-	3362 ± 638	1.00 ± 0.19	-	<0.1
		0.1	7.26 ± 1.00	2.09 ± 0.29	*	12272 ± 730	3.65 ± 0.22	*	
		0.25	7.42 ± 0.91	2.13 ± 0.26	*	11294 ± 3187	3.36 ± 0.95	*	
		0.5	10.21 ± 2.17	2.93 ± 0.62	**	19731 ± 4968	5.87 ± 1.48	**	
		1	11.14 ± 2.13	3.20 ± 0.61	**	23037 ± 6535	6.85 ± 1.94	**	
Formaldehyde	ACE	0	3.52 ± 0.57	1.00 ± 0.16	-	2711 ± 712	1.00 ± 0.26	-	1.16
		0.1	3.93 ± 0.31	1.12 ± 0.09	-	3730 ± 1056	1.38 ± 0.39	-	
		0.25	4.94 ± 0.50	1.40 ± 0.14	*	4731 ± 1345	1.75 ± 0.50	*	
		0.5	5.18 ± 0.43	1.47 ± 0.12	*	4019 ± 1246	1.48 ± 0.46	*	
		1	6.18 ± 1.57	1.76 ± 0.45	*	7456 ± 2763	2.75 ± 1.02	*	
		2.5	9.42 ± 0.48	2.68 ± 0.14	**	13833 ± 3018	5.10 ± 1.11	*	
Cinnamic aldehyde	AOO	0	4.55 ± 0.27	1.00 ± 0.06	-	4411 ± 614	1.00 ± 0.14	-	2.98
		1	7.34 ± 1.05	1.61 ± 0.23	*	9199 ± 2896	2.09 ± 0.66	*	
		2.5	8.86 ± 0.75	1.95 ± 0.17	**	11743 ± 2030	2.66 ± 0.46	**	
		5	11.86 ± 0.41	2.61 ± 0.09	**	19502 ± 1914	4.42 ± 0.43	**	
		15	16.74 ± 1.95	3.68 ± 0.43	*	20848 ± 2649	4.73 ± 0.60	**	
Isoeugenol	AOO	0	4.19 ± 0.01	1.00 ± 0.00	-	3528 ± 1536	1.00 ± 0.44	-	2.35
		2.5	6.73 ± 0.87	1.61 ± 0.21	*	10982 ± 3313	3.11 ± 0.94	*	
		5	9.48 ± 1.05	2.26 ± 0.25	*	15473 ± 3601	4.39 ± 1.02	*	
		10	14.59 ± 1.16	3.48 ± 0.28	**	23869 ± 658	6.77 ± 0.19	**	
		25	21.72 ± 0.48	5.18 ± 0.11	**	43598 ± 4834	12.36 ± 1.37	**	
		50	20.31 ± 2.15	4.85 ± 0.51	**	37359 ± 6445	10.59 ± 1.83	**	
CoCl2	DMSO	0	5.98 ± 0.96	1.00 ± 0.16	-	6674 ± 1322	1.00 ± 0.20	-	3.27
		1	10.11 ± 0.38	1.69 ± 0.06	**	14270 ± 2434	2.14 ± 0.36	**	
		2.5	11.99 ± 0.66	2.01 ± 0.11	**	18117 ± 495	2.71 ± 0.07	**	
		5	15.61 ± 2.59	2.61 ± 0.43	**	24298 ± 4910	3.64 ± 0.74	**	

表 2 (続き)

Chemicals	Vehicle	%	Lymph node weight(mg)				ATP content(RLU)				EC3
			Average ± S. E.		SI ± S. E.		Average ± S. E.		SI ± S. E.		
Eugenol	AOO	0	4.37 ± 0.20	1.00 ± 0.05	-	3871 ± 298	1.00 ± 0.08	-	4.50		
		5	7.32 ± 0.25	1.67 ± 0.06	**	12533 ± 2216	3.24 ± 0.57	*			
		10	10.19 ± 1.35	2.33 ± 0.31	**	18535 ± 3149	4.79 ± 0.81	**			
		25	12.79 ± 0.73	2.92 ± 0.17	**	27372 ± 1383	7.07 ± 0.36	**			
Resorcinol	AOO	0	4.71 ± 0.46	1.00 ± 0.10	-	4907 ± 568	1.00 ± 0.12	-	6.44		
		5	6.81 ± 0.44	1.45 ± 0.09	**	12099 ± 293	2.47 ± 0.06	**			
		10	10.47 ± 1.53	2.22 ± 0.32	**	21230 ± 3686	4.33 ± 0.75	*			
		25	9.99 ± 1.61	2.12 ± 0.34	**	17211 ± 5344	3.51 ± 1.09				
Benzocaine	AOO	0	3.39 ± 0.34	1.00 ± 0.10	-	2580 ± 448	1.00 ± 0.17	-	6.57		
		5	5.94 ± 0.89	1.75 ± 0.26	**	6766 ± 3039	2.62 ± 1.18				
		10	7.12 ± 0.64	2.10 ± 0.19	**	9857 ± 1071	3.82 ± 0.42	**			
		25	6.72 ± 0.63	1.98 ± 0.19	**	12480 ± 5623	4.84 ± 2.18				
Abietic acid	AOO	0	3.83 ± 0.15	1.00 ± 0.04	-	3014 ± 378	1.00 ± 0.13	-	7.90		
		5	5.87 ± 0.59	1.53 ± 0.16	*	6752 ± 2018	2.24 ± 0.67				
		10	7.55 ± 0.11	1.97 ± 0.03	**	10701 ± 1977	3.55 ± 0.66	*			
		25	11.28 ± 0.19	2.95 ± 0.05	**	18857 ± 1464	6.26 ± 0.49	**			
Hexyl cinnamic aldehyde	AOO	0	4.37 ± 0.20	1.00 ± 0.05	-	3871 ± 298	1.00 ± 0.08	-	11.62		
		5	4.69 ± 0.71	1.07 ± 0.16		5005 ± 1676	1.29 ± 0.43				
		10	7.94 ± 0.83	1.82 ± 0.19	*	9981 ± 1947	2.58 ± 0.50	*			
		25	12.84 ± 0.95	2.94 ± 0.22	**	25038 ± 5783	6.47 ± 1.49	*			
Imidazolidinyl urea	DMF	0	4.03 ± 0.47	1.00 ± 0.12	-	3428 ± 784	1.00 ± 0.23	-	18.77		
		10	5.65 ± 0.70	1.40 ± 0.17	*	8084 ± 1474	2.36 ± 0.43	**			
		25	7.41 ± 0.18	1.84 ± 0.04	**	11848 ± 1655	3.46 ± 0.48	**			
		50	9.43 ± 0.69	2.34 ± 0.17	**	16010 ± 1404	4.67 ± 0.41	**			
Mercaptobenzothiazol	DMF	0	4.03 ± 0.47	1.00 ± 0.12	-	3428 ± 784	1.00 ± 0.23	-	N. C.		
		10	4.86 ± 0.10	1.21 ± 0.02		6859 ± 907	2.00 ± 0.26	**			
		25	4.66 ± 0.74	1.16 ± 0.18		4601 ± 1864	1.34 ± 0.54				
		50	4.69 ± 0.04	1.17 ± 0.01		3675 ± 726	1.07 ± 0.21				
Citral	AOO	0	4.55 ± 0.27	1.00 ± 0.06	-	4411 ± 614	1.00 ± 0.14	-	15.63		
		5	8.19 ± 1.34	1.80 ± 0.30	*	8706 ± 3005	1.97 ± 0.68				
		10	9.65 ± 1.04	2.12 ± 0.23	**	9304 ± 1335	2.11 ± 0.30	**			
		15	11.22 ± 1.07	2.47 ± 0.23	**	12814 ± 1054	2.91 ± 0.24	**			
		25	13.29 ± 2.17	2.92 ± 0.48	*	19426 ± 2270	4.40 ± 0.51	**			
Hydroxycitronellal	AOO	0	3.63 ± 0.54	1.00 ± 0.15	-	2151 ± 326	1.00 ± 0.15	-	13.74		
		10	6.09 ± 0.43	1.68 ± 0.12	**	4862 ± 545	2.26 ± 0.25	**			
		25	10.51 ± 0.68	2.89 ± 0.19	**	11246 ± 1702	5.23 ± 0.79	*			
		50	11.26 ± 0.26	3.10 ± 0.07	**	12234 ± 2494	5.69 ± 1.16	*			
SLS	DMF	0	3.63 ± 0.51	1.00 ± 0.14	-	2668 ± 883	1.00 ± 0.33	-	8.28		
		1	3.98 ± 0.57	1.10 ± 0.16		3515 ± 438	1.32 ± 0.16				
		2.5	5.17 ± 0.60	1.43 ± 0.17	*	6535 ± 1309	2.45 ± 0.49	*			
		5	6.13 ± 1.35	1.69 ± 0.37	*	6006 ± 2186	2.25 ± 0.82				
		10	6.73 ± 0.52	1.86 ± 0.14	**	9050 ± 1542	3.39 ± 0.58	**			
NiSO4	DMSO	0	5.98 ± 0.96	1.00 ± 0.16	-	6674 ± 1322	1.00 ± 0.20	-	N. C.		
		1	6.71 ± 1.12	1.12 ± 0.19		9098 ± 1423	1.36 ± 0.21				
		2.5	7.75 ± 0.31	1.30 ± 0.05	*	14496 ± 5119	2.17 ± 0.77				
		5	8.68 ± 1.03	1.45 ± 0.17	*	12346 ± 2715	1.85 ± 0.41	*			
Benzalkonium chloride	AOO	0	3.41 ± 0.21	1.00 ± 0.06	-	1733 ± 76	1.00 ± 0.04	-	0.58		
		0.5	5.37 ± 0.44	1.58 ± 0.13	**	4330 ± 1129	2.50 ± 0.65				
		1	7.97 ± 0.76	2.34 ± 0.22	**	9449 ± 1259	5.45 ± 0.73	*			
		2.5	8.76 ± 0.68	2.57 ± 0.20	**	10080 ± 1562	5.82 ± 0.90	*			

表 2 (続き)

Chemicals	Vehicle	%	Lymph node weight(mg)			ATP content(RLU)			EC3
			Average ± S. E.	SI	± S. E.	Average ± S. E.	SI	± S. E.	
Propyl paraben	AOO	0	4.37 ± 0.20	1.00 ± 0.05		3871 ± 298	1.00 ± 0.08		N. C.
		5	4.25 ± 0.38	0.97 ± 0.09		4288 ± 894	1.11 ± 0.23		
		10	4.51 ± 0.62	1.03 ± 0.14		4390 ± 817	1.13 ± 0.21		
		25	4.19 ± 0.50	0.96 ± 0.11		4959 ± 1629	1.28 ± 0.42		
Diethylphthalate	AOO	0	3.63 ± 0.54	1.00 ± 0.15		2151 ± 326	1.00 ± 0.15		N. C.
		25	3.97 ± 0.57	1.09 ± 0.16		2336 ± 579	1.09 ± 0.27		
		50	3.80 ± 0.44	1.05 ± 0.12		1876 ± 457	0.87 ± 0.21		
		100	3.79 ± 0.55	1.04 ± 0.15		1745 ± 350	0.81 ± 0.16		
1-Bromobutane	AOO	0	3.63 ± 0.54	1.00 ± 0.15		2151 ± 326	1.00 ± 0.15		N. C.
		5	4.28 ± 0.37	1.18 ± 0.10		3154 ± 795	1.47 ± 0.37		
		10	3.95 ± 0.48	1.09 ± 0.13		1606 ± 531	0.75 ± 0.25		
		25	5.05 ± 0.85	1.39 ± 0.23		3539 ± 534	1.65 ± 0.25 *		
Methylsalicylate	AOO	0	4.37 ± 0.20	1.00 ± 0.05		3871 ± 298	1.00 ± 0.08		N. C.
		5	4.20 ± 0.40	0.96 ± 0.09		2773 ± 717	0.72 ± 0.19		
		10	4.92 ± 0.40	1.13 ± 0.09		3723 ± 1195	0.96 ± 0.31		
		25	5.14 ± 0.46	1.18 ± 0.11		4661 ± 598	1.20 ± 0.15		
Chlorobenzene	AOO	0	3.63 ± 0.54	1.00 ± 0.15		2151 ± 326	1.00 ± 0.15		N. C.
		5	3.92 ± 0.23	1.08 ± 0.06		1714 ± 460	0.80 ± 0.21		
		10	3.96 ± 0.03	1.09 ± 0.01		2342 ± 362	1.09 ± 0.17		
		25	6.48 ± 0.95	1.78 ± 0.26 **		5255 ± 1946	2.44 ± 0.90		
Lactic acid	DMSO	0	6.31 ± 1.09	1.00 ± 0.17		10204 ± 2395	1.00 ± 0.23		N. C.
		5	5.92 ± 1.02	0.94 ± 0.16		10582 ± 2726	1.04 ± 0.27		
		10	6.34 ± 0.09	1.00 ± 0.01		10841 ± 986	1.06 ± 0.10		
		25	6.05 ± 1.02	0.96 ± 0.16		9832 ± 2883	0.96 ± 0.28		
		50	6.15 ± 0.25	0.97 ± 0.04		10106 ± 1213	0.99 ± 0.12		
Hexane	AOO	0	3.87 ± 0.60	1.00 ± 0.15		3129 ± 735	1.00 ± 0.23		N. C.
		25	3.95 ± 0.67	1.02 ± 0.17		3377 ± 271	1.08 ± 0.09		
		50	4.22 ± 0.32	1.09 ± 0.08		2740 ± 243	0.88 ± 0.08		
		100	6.18 ± 0.43	1.60 ± 0.11 **		7226 ± 1331	2.31 ± 0.43 **		
Isopropanol	AOO	0	3.45 ± 0.32	1.00 ± 0.09		2115 ± 99	1.00 ± 0.05		N. C.
		10	3.34 ± 0.21	0.97 ± 0.06		2218 ± 632	1.05 ± 0.30		
		25	3.74 ± 0.42	1.08 ± 0.12		2288 ± 1099	1.08 ± 0.52		
		50	3.13 ± 0.84	0.91 ± 0.24		1801 ± 783	0.85 ± 0.37		

Data presented as mean ± S. E., * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

ACE, acetone; AOO, acetone/olive oil(4:1, v/v); DMF, dimethylformamide; DMSO, dimethylsulfoxide; EC3, mathematically estimated concentration of chemical required to induce a 3-fold stimulation index (SI); NC, not calculated.

表 3 31 物質の判定結果のまとめおよび他の試験法による結果との比較

Chemicals	LLNA-DA	*LLNA	*GPMT/BA	*HMT/HPTA
2,4-Dinitrochlorobenzene	+	+	+	
<i>p</i> -Phenylenediamine	+	+	+	+
Tolylene diisocyanate	+	+		
Glutaraldehyde	+	+		
K ₂ Cr ₂ O ₇	+	+	+	+
Phthalic anhydride	+	+	+	
Trimellitic anhydride	+	+		
Formaldehyde	+	+	+	+
Cinnamic aldehyde	+	+	+	+
Isoeugenol	+	+	+	+
CoCl ₂	+	+	+	+
Eugenol	+	+	+	+
Resorcinol	+	+	-	+
Benzocaine	+	+/-	+	+/-
Abietic acid	+	+	+	+
Hexyl cinnamic aldehyde	+	+	+	
Mercaptobenzothiazol	-	+	+	+
Citral	+	+	+	+
Hydroxycitronellal	+	+	+	+
Imidazolidinyl urea	+	+	+	+
SLS	+	+	-	-
NiSO ₄	-	-	+	+
Benzalkonium chloride	+	-	-	+
Propyl paraben	-	-	-	+/-
Diethylphthalate	-	-		
1-Bromobutane	-	-		
Methysalicylate	-	-	-	-
Chlorobenzene	-	-	-	
Lactic acid	-	-	-	
Hexane	-	-		-
Isopropanol	-	-	-	

* K. E. Haneke, *et al.*, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, (2001) **34**, 274-286. LLNA, local lymph node assay; GPMT, guinea pig maximization test; BA, Buehler assay; HMT, human maximization test; HPTA, human patch test allergen.