

表 4-1 LLNA-DA の検出力 (vs. LLNA)

		LLNA	
		Positive	Negative
LLNA-DA	Positive	2,4-Dinitrochlorobenzene <i>p</i> -Phenylene diamine Cinnamaldehyde Isoeugenol Eugenol Abietic acid Imidazolidinyl urea Trimellitic anhydride Phthalic anhydride Glutaraldehyde Formaldehyde Hydroxycitronellal Resorcinol Toluene diisocyanate Hexylcinnamic aldehyde Citral CoCl <sub>2</sub> K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> SLS	19chemicals Benzalkonium chloride 1chemical
	Negative	Mercaptobenzothiazol 1chemical	1-Bromobutane Diethylphthalate Propyl paraben Methyl salicylate Chlorobenzene Lactic acid NiSO <sub>4</sub> Hexane Isopropanol 9chemicals

Comparison	No. of comparisons	Sensitivity	Specificity	Positive Predictivity	Negative Predictivity	Accuracy
LLNA-DA vs LLNA	30	95% (19 / 20)	90% (9 / 10)	95% (19 / 20)	90% (9 / 10)	93% (28 / 30)

$$\kappa = 0.850$$

LLNA, local lymph node assay

表 4-2 LLNA-DA の検出力 (vs. GPMT/BA)

		GPMT/BA	
		Positive	Negative
LLNA-DA	Positive	2,4-Dinitrochlorobenzene <i>p</i> -Phenylenediamine Phthalic anhydride Formaldehyde Cinnamic aldehyde Isoeugenol Eugenol Abietic acid Hydroxycitronellal Imidazolidinyl urea Benzocaine K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> CoCl <sub>2</sub> Hexylcinnamic aldehyde Citral <i>15chemicals</i>	Resorcinol SLS Benzalkonium chloride <i>3chemicals</i>
	Negative	Mercaptobenzothiazol NiSO <sub>4</sub> <i>2chemicals</i>	Propyl paraben Methsalicylate Chlorobenzene Lactic acid Isopropanol <i>5chemicals</i>

Comparison	No. of comparisons	Sensitivity	Specificity	Positive Predictivity	Negative Predictivity	Accuracy
LLNA-DA vs GPMT/BA	25	88% (15 / 17)	63% (5 / 8)	83% (15 / 18)	71% (5 / 7)	80% (20 / 25)

$$\kappa = 0.525$$

GPMT, guinea pig maximization test; BA, Buehler assay.

表 4-3 LLNA-DA の検出力 (vs. HMT/HPTA)

		HMT/HPTA	
		Positive	Negative
LLNA-DA	Positive	<i>p</i> -Phenylenediamine Formaldehyde Cinnamic aldehyde Isoeugenol Eugenol Resorcinol Abietic acid Citral Hydroxycitronellal Imidazolidinyl urea Benzalkonium chloride K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> CoCl <sub>2</sub> <b>13chemicals</b>	SLS <b>1chemical</b>
	Negative	Mercaptobenzothiazol NiSO <sub>4</sub> Propyl paraben <b>3chemicals</b>	Methsalicylate Hexane <b>2chemicals</b>

Comparison	No. of comparisons	Sensitivity	Specificity	Positive Predictivity	Negative Predictivity	Accuracy
LLNA-DA vs HMT/HPTA	19	81% (13 / 16)	67% (2 / 3)	93% (13 / 14)	40% (2 / 5)	79% (15 / 19)

$$\kappa = 0.377$$

HMT, human maximization test; HPTA, human patch test allergen.

2007年 11月8日

LLNA - DA 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

### 【背景および目的】

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 実験共に、被験物質をコード化した後、試料等手配担当者により 3 濃度の溶液または懸濁液に調製され、それを各施設に送付して評価する方法が採られた。従って、被験物質を調製した後、動物に適用するまでの間に一定の保存期間があったことになる。これに対し、2007 年 8 月 1 日に実施された評価委員会において、各被験物質の溶媒中での保存安定性の確認が必要であるとの指摘がなされた。

そこで、バリデーション研究に用いられた 14 物質の内、最も安定性が疑問視される物質について、使用した溶媒中での経時変化を調査することとした。

### 【方法】

調査する被験物質は小島 肇氏 (JaCVAM) と協議の結果、3-Aminophenol (3-AP)、Abietic acid、Hexylcinnamic aldehyde (HCA) の 3 物質とした。3-AP と Abietic acid は 14 物質中で化学的に最も不安定と予想された。特に 3-AP は、各施設での冷蔵保存中に析出が認められ、評価委員会においても安定性が最も疑問視された被験物質である。HCA は比較的安定であると言われているが、第 1 実験、第 2 実験を通して全 17 施設で評価した被験物質であることから、調査対象に加えた。

バリデーション研究においては、被験物質は各施設で動物が入荷する週に合わせて調製、送付された。翌週に動物への適用が開始され、翌々週には 4 回目の塗布が終了する日程で使用されている。従って、溶媒中での経時変化を確認する期間は 3 週間とした。

被験物質溶液または懸濁液の送付は冷蔵条件で行われた。また、各施設においては、使用時以外は冷蔵 (0℃~10℃、より望ましくは 2℃~8℃) で保管することが SOP に定められている。即ちバリデーション研究においては、調製後の溶液または懸濁液は原則としては冷蔵で保管され、調製作業、梱包作業、塗布操作など一時的には室温に置かれていたと考えられる。そこで、冷蔵 (4℃) と室温 (25℃) の 2 つの温度条件における経時変化を確認することとした。

バリデーション研究においては、被験物質はそれぞれ 3 用量に調製された。経時変化の調査は、バリデーション研究と同じ溶媒を使用し各々の最高用量の濃度に調製した試料について実施した。即ち、3-AP は 10% の AOO 溶液、Abietic acid および HCA は 25% の AOO 溶液を調査対象とした。

試料の調製方法、分析方法の詳細は添付資料「試験報告書 (E-398)」に記した。

**【結果の要約】**

結果の詳細は添付資料「試験報告書（E-398）」に記した。

今回調査対象とした3種の被験物質は、冷蔵条件、室温条件共に3週間の間、AOO 溶媒中において安定であることが確認された。従って、LLNA-DA 法バリデーション研究においても試験結果に影響を与えるような被験物質の濃度低下は起こらなかったものと考えられる。

**【添付資料】**

試験報告書（E-398）

以上

評価・解析センター

研開 TL	責任者
	

# 試 験 報 告 書

(E-398)

作成：2007年10月2日

ダイセル化学工業株式会社

1. 表題  
LLNA-DA 試験サンプルの安定性試験

2. 試験目的  
LLNA-DA 法バリデーション研究で用いた被験物質の、溶媒中での安定性についての知見を得る。

3. 試験番号  
E-398

4. 被験物質

名称	CAS No.	試薬会社(Lot No.)
3-アミノフェノール(3-AP)	591-27-5	和光純薬製 和光一級 (LTJ4286)
アビエチン酸	514-10-3	和光純薬製 (LDQ 0632)
$\alpha$ -ヘキシルシンナムアルデヒド(HCA)	101-86-0	和光純薬製 和光一級 (WKQ3938)

5. 試験条件

試験濃度…アビエチン酸: 25%(w/v)、HCA: 25%(w/v)、3-AP: 10%(w/v)

試験溶液…アセトン/オリーブオイル=4/1(v/v)溶液(以下、AOO 溶液と称す)

(アセトン: 関東化学製 Lot.810Y3052、オリーブオイル: ヨシダ製薬製 製造番号 LL-2)

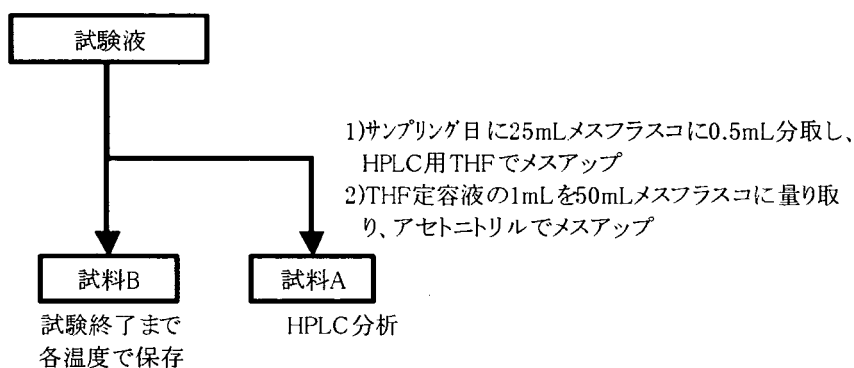
試験温度…4 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C、25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C

試験期間…約 3 週間

6. 試験方法

(1) アビエチン酸、HCA

被験物質 2.5g を 10mL メスフラスコに精密に秤り取り、AOO 溶液を加えて溶解し、定容した。この試験液 0.5mL を 25mL メスフラスコに量り取り(0 日目のサンプリング)、HPLC 用 THF で定容した液 1mL を 50mL メスフラスコに量り取り、アセトニトリルで定容し、HPLC 分析により濃度を求めた。この 0 日目のサンプリングを行った後、試験液を半量になるようにサンプル瓶 2 つに小分けし、4 $^{\circ}$ C 及び 25 $^{\circ}$ C で保存し、適時サンプリングを行い、濃度の経時変化を見た。



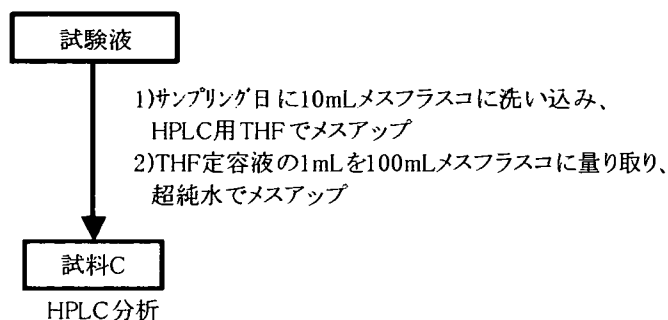
<アビエチン酸、HCA の安定性試験>

(2) 3-AP

被験物質 100mg を 1mL メスフラスコに精密に秤り取り、AOO 溶液を加えて溶解し、定容した(9 個)。このメスフラスコの 1 つを 0 日目用とし、残りの 4 個ずつを 4 $^{\circ}$ C 及び 25 $^{\circ}$ C で保存した。濃度測定の際には、試験液の入ったメスフラスコの内容物を HPLC 用 THF で 10mL メスフラスコに洗い込み、定容した液 1mL を 100mL メスフラスコ



に量り取り、超純水で定容し、HPLC 分析により濃度を求めた。



<3-AP の安定性試験>

7. 試料 A 及び C 中の被験物質の分析方法

試料 A 及び C の分析方法を以下に示した。

(1) 分析装置

Waters Alliance system (Waters 製)

本体 : 2695 セパレーションモジュール  
カラムオープン : カラムヒーター/クーラー  
検出器 : 2487 デュアル UV/VIS 検出器  
データ処理ソフト : Empower™2

(2) 分析条件

① 試料 A

カラム : Atlantis T3 3 $\mu$ m ( $\phi$  2.1mm $\times$ 150mm) (Waters 製)  
カラム温度 : 40°C  
溶離液 : 0.1%TFA 水溶液 / 含 0.1%TFA アセトニトリル=25/75  
流量 : 0.2mL/min  
検出 : アビエチン酸 ; UV240nm、HCA ; UV280nm  
注入量 : 5 $\mu$ L

② 試料 C

カラム : Atlantis T3 3 $\mu$ m ( $\phi$  2.1mm $\times$ 150mm) (Waters 製)  
カラム温度 : 40°C  
溶離液 : 0.1%TFA 水溶液 / 含 0.1%TFA アセトニトリル=98/2  
流量 : 0.2mL/min  
検出 : UV210nm  
注入量 : 5 $\mu$ L

(3) 標準液の調製

① アビエチン酸・HCA

各被験物質をアセトニトリルに溶かした液を分析用標準液とした。

② 3-AP

被験物質を超純水に溶かした液を分析用標準液とした。

8. 試験結果

各被験物質の経時変化の結果を表 1~3 及び図 1~3 に、代表的なクロマトグラムを図 4~6 に示した。

9. 考察及び結論

いずれの被験物質及び温度条件においても3週間の間、安定であることが確認できた。以上より、今回試験した3種の被験物質について、本条件下では安定であり、LLNA・DA法バリデーション研究における試験結果に影響を与えるような、被験物質の濃度低下はなかったものと考えられる。

10. 表及び図

表 1-1 アビエチン酸の濃度経時変化(25℃)  
初期濃度：250.044g/L

経過日数(日)	標準液濃度(mg/L)	標準液面積値(μV·s)	試料A面積値(μV·s)	試料A濃度*1(mg/L)	試験液濃度*2(g/L)	保持率*3(%)
0	99.2	3376034	3434758	100.9	252.25	100.9
3	96.1	3293850	3454311	100.8	252.00	100.8
8	100.2	3226994	3384455	105.1	262.75	105.1
15	96.8	3133834	3258916	100.7	251.75	100.7
22	101.3	3337634	3275941	99.4	248.50	99.4

表 1-2 アビエチン酸の濃度経時変化(4℃)  
初期濃度：250.044g/L

経過日数(日)	標準液濃度(mg/L)	標準液面積値(μV·s)	試料A面積値(μV·s)	試料A濃度*1(mg/L)	試験液濃度*2(g/L)	保持率*3(%)
0	99.2	3376034	3434758	100.9	252.25	100.9
3	96.1	3293850	3504215	102.2	255.50	102.2
8	100.2	3226994	3440618	106.8	267.00	106.8
15	96.8	3133834	3451137	106.6	266.50	106.6
22	101.3	3337634	3503357	106.3	265.75	106.3

\*1: 試料A濃度(mg/L) =  $\frac{\text{試料A面積値}(\mu V \cdot s)}{\text{標準液面積値}(\mu V \cdot s)} \times \text{標準液濃度(mg/L)}$

\*2: 試験液濃度(g/L) =  $\frac{\text{試料A濃度(mg/L)}}{\frac{1000(\text{mg/g})}{\text{希釈倍率2500}}}$

\*3: 保持率(%) =  $\frac{\text{試験液濃度(g/L)}}{\text{初期濃度250.044(g/L)}} \times 100$

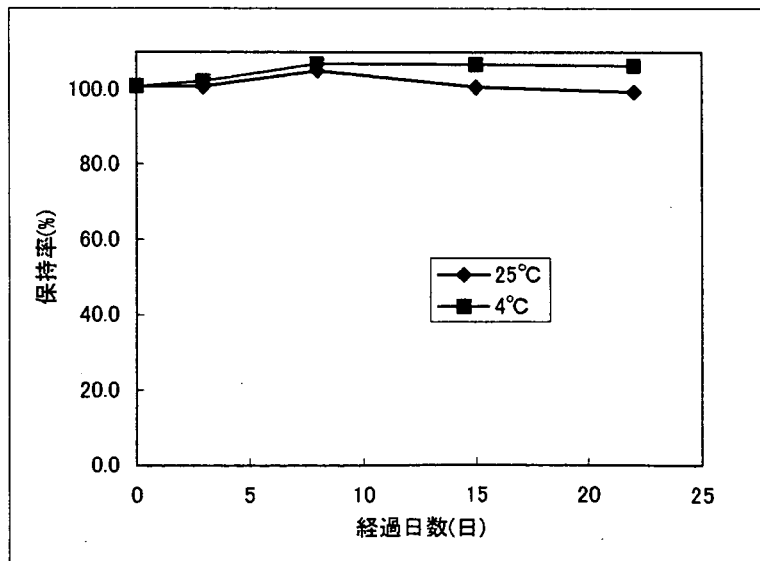


図 1 アビエチン酸の濃度経時変化

表 2-1 HCA の濃度経時変化(25℃)

初期濃度：250.043g/L

経過日数 (日)	標準液濃度 (mg/L)	標準液面積値 ( $\mu V \cdot s$ )	試料 A 面積値 ( $\mu V \cdot s$ )	試料A濃度*1 (mg/L)	試験液濃度*2 (g/L)	保持率*3 (%)
0	110.6	15647271	13864225	98.0	245.00	98.0
3	103.1	13947325	14236017	105.2	263.00	105.2
8	109.0	15374237	14208493	100.7	251.75	100.7
15	107.0	14730241	14200291	103.2	258.00	103.2
22	104.0	14525574	14032345	100.5	251.25	100.5

表 2-2 HCA の濃度経時変化(4℃)

初期濃度：250.043g/L

経過日数 (日)	標準液濃度 (mg/L)	標準液面積値 ( $\mu V \cdot s$ )	試料 A 面積値 ( $\mu V \cdot s$ )	試料A濃度*1 (mg/L)	試験液濃度*2 (g/L)	保持率*3 (%)
0	110.6	15647271	13864225	98.0	245.00	98.0
3	103.1	13947325	14360613	106.2	265.50	106.2
8	109.0	15374237	13891921	98.5	246.25	98.5
15	107.0	14730241	14080034	102.3	255.75	102.3
22	104.0	14525574	14034343	100.5	251.25	100.5

$$*1: \text{試料A濃度(mg/L)} = \frac{\text{試料A面積値}(\mu V \cdot s)}{\text{標準液面積値}(\mu V \cdot s)} \times \text{標準液濃度(mg/L)}$$

$$*2: \text{試験液濃度(g/L)} = \frac{\text{試料A濃度(mg/L)}}{\frac{1000(\text{mg/g})}{\text{希釈倍率}2500}}$$

$$*3: \text{保持率}(\%) = \frac{\text{試験液濃度(g/L)}}{\text{初期濃度}250.043(\text{g/L})} \times 100$$

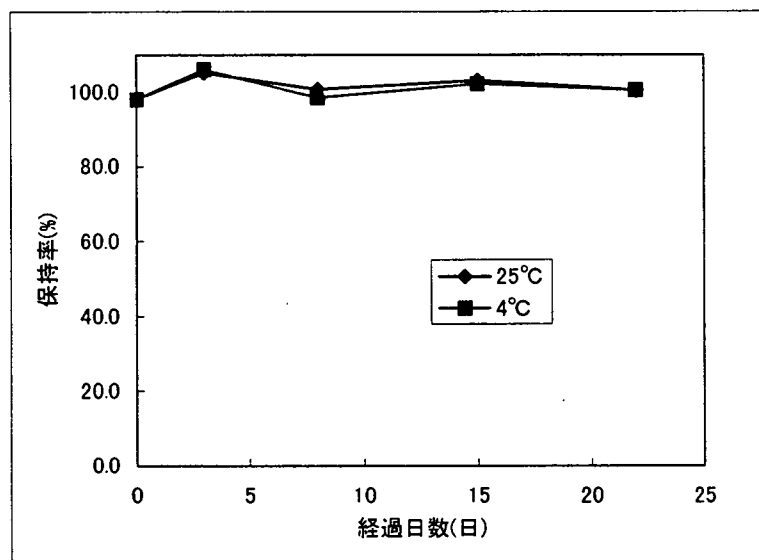


図 2 HCA の濃度経時変化

表 3-1 3-AP の濃度経時変化(25℃)

経過日数 (日)	標準液濃度 (mg/L)	標準液面積値 ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	仕込量 (mg)	試料 C 面積値 ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	回収量*1 (mg)	保持率*2 (%)
0	102.2	7424060	99.92	7307732	100.6	100.7
2	95.8	7180795	99.73	7278296	97.1	97.4
7	96.8	7011922	100.04	7357095	101.6	101.6
14	103.0	7687670	100.68	7324762	98.1	97.4
21	99.4	7396330	100.65	7131906	95.8	95.2

表 3-2 3-AP の濃度経時変化(4℃)

経過日数 (日)	標準液濃度 (mg/L)	標準液面積値 ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	仕込量 (mg)	試料 C 面積値 ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	回収量*1 (mg)	保持率*2 (%)
0	102.2	7424060	99.92	7307732	100.6	100.7
2	95.8	7180795	100.37	7467677	99.6	99.2
7	96.8	7011922	100.06	7495463	103.5	103.4
14	103.0	7687670	99.93	7352630	98.5	98.6
21	99.4	7396330	100.01	7351448	98.8	98.8

\*1: 回収量(mg) =  $\frac{\text{試料C面積値}(\mu\text{V}\cdot\text{s})}{\text{標準液面積値}(\mu\text{V}\cdot\text{s})} \times \text{標準液濃度}(\text{mg/L}) \times 0.1(\text{L}) \times 10$

\*2: 保持率(%) =  $\frac{\text{回収量}(\text{mg})}{\text{仕込量}(\text{mg})} \times 100$

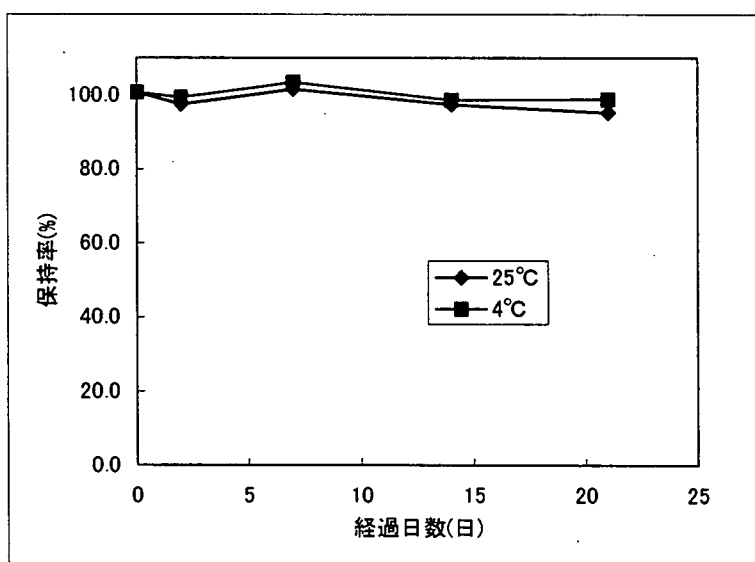
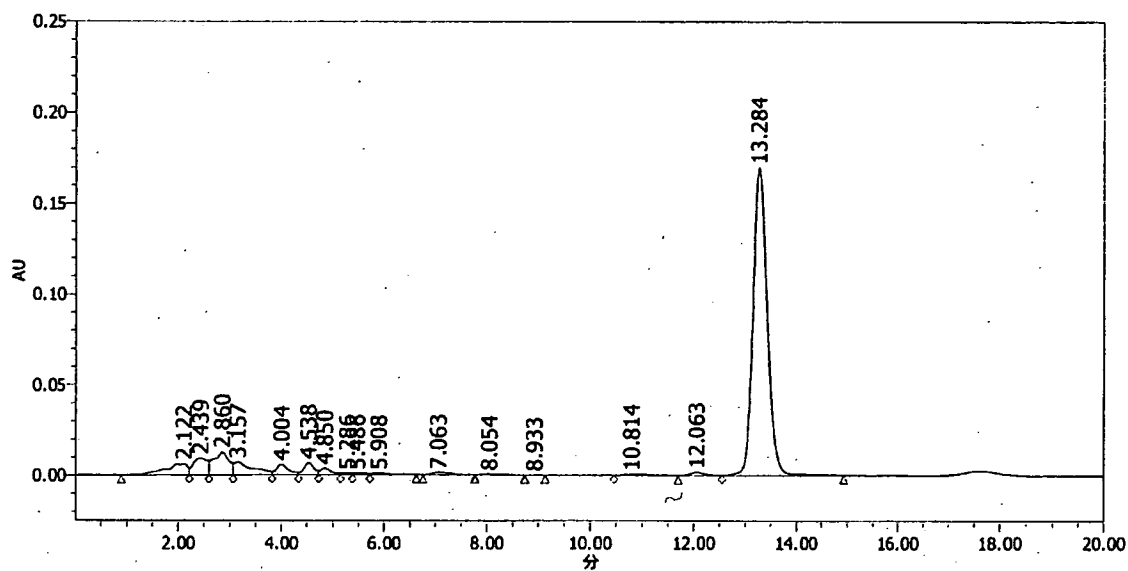


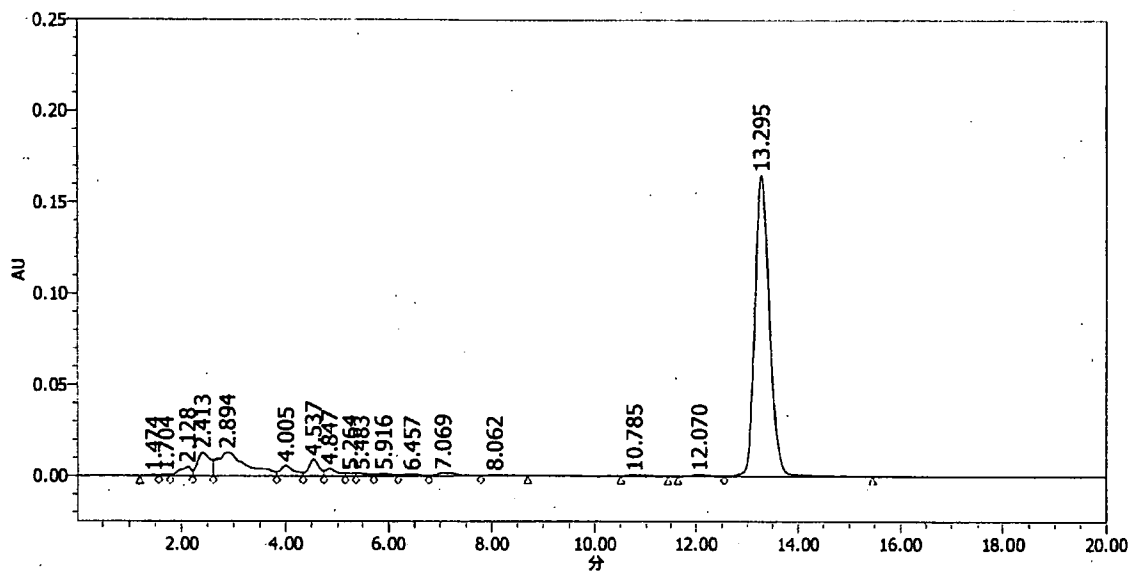
図 3 3-AP の濃度経時変化



	保持時間 (分)	面積 ( $\mu$ V秒)	高さ ( $\mu$ V)	%面積
1	2.122	188494	6389	4.16
2	2.439	177066	9333	3.90
3	2.860	262749	12617	5.79
4	3.157	185137	7302	4.08
5	4.004	99414	5971	2.19
6	4.538	93414	6790	2.06
7	4.850	52812	3567	1.16
8	5.286	11977	908	0.26
9	5.486	15683	899	0.35
10	5.908	17597	758	0.39
11	7.063	30632	1350	0.68
12	8.054	11616	596	0.26
13	8.933	560	51	0.01
14	10.814	20052	638	0.44
15	12.063	31696	1751	0.70

	保持時間 (分)	面積 ( $\mu$ V秒)	高さ ( $\mu$ V)	%面積
16	13.284	3337634	169835	73.57

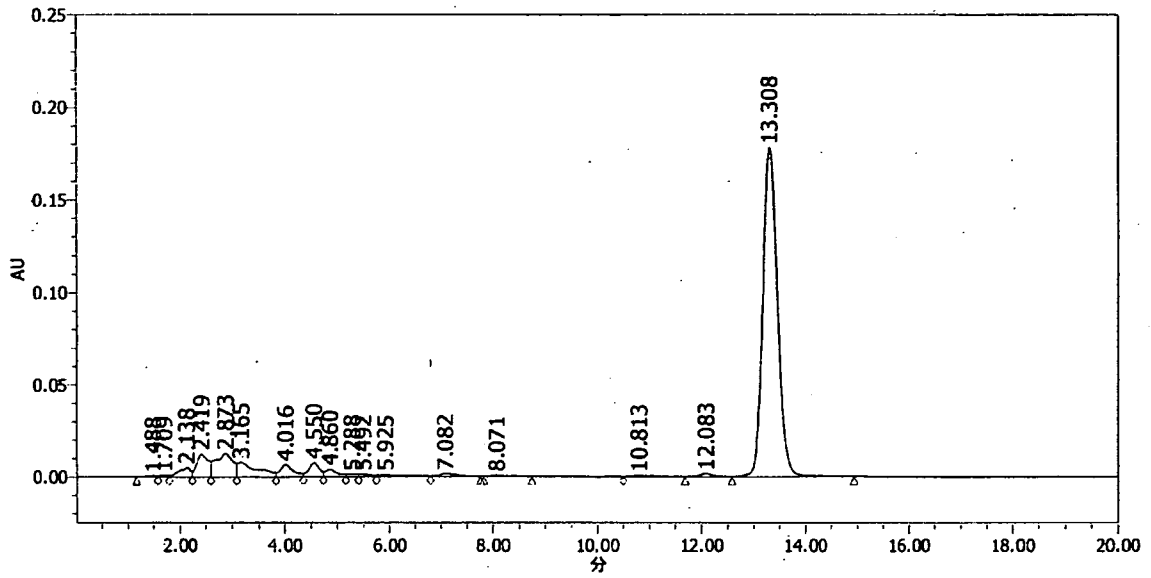
図 4-1 アピエチン酸の HPLC クロマトグラム(22 日目、101.3mg/L 標準液)



	保持時間 (分)	面積 ( $\mu$ V秒)	高さ ( $\mu$ V)	%面積
1	1.474	3573	310	0.08
2	1.704	5268	506	0.12
3	2.128	72744	4932	1.61
4	2.413	216623	12628	4.78
5	2.894	496086	12664	10.95
6	4.005	98602	5563	2.18
7	4.537	122218	8941	2.70
8	4.847	60809	3834	1.34
9	5.264	15709	1246	0.35
10	5.483	23252	1223	0.51
11	5.916	23403	1123	0.52
12	6.457	22202	951	0.49
13	7.069	39359	1551	0.87
14	8.062	17009	816	0.38
15	10.785	19869	719	0.44

	保持時間 (分)	面積 ( $\mu$ V秒)	高さ ( $\mu$ V)	%面積
16	12.070	18846	1034	0.42
17	13.295	3275941	165439	72.29

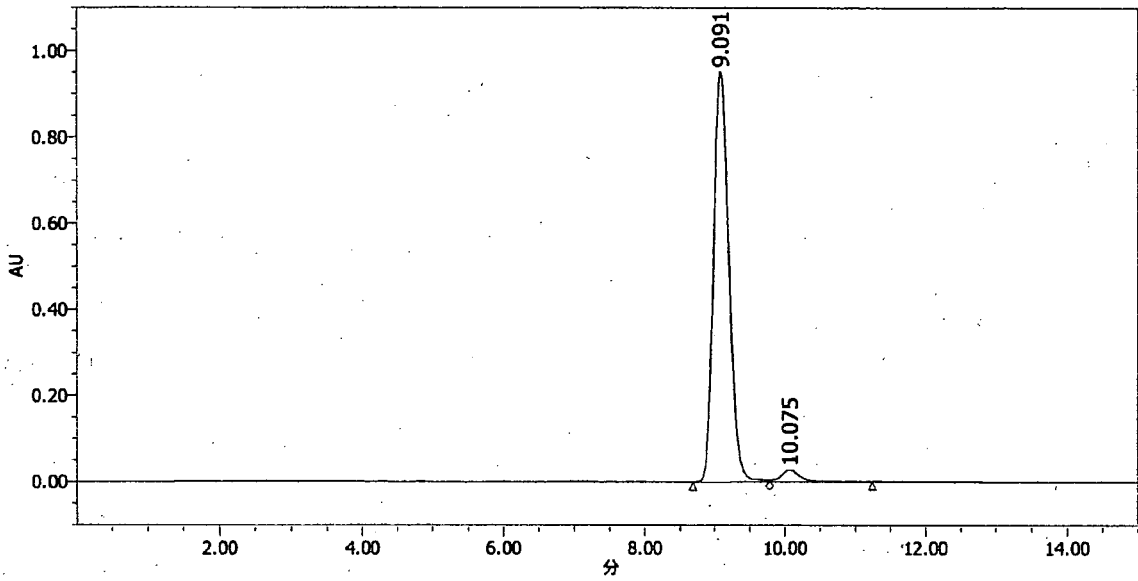
図 4-2 アビエチン酸の HPLC クロマトグラム(22 日目、25°C)



	保持時間 (分)	面積 ( $\mu$ V秒)	高さ ( $\mu$ V)	%面積
1	1.488	3397	292	0.07
2	1.709	4991	482	0.11
3	2.138	72651	4920	1.55
4	2.419	191951	12238	4.09
5	2.873	280483	12518	5.97
6	3.165	196184	7729	4.18
7	4.016	108498	6371	2.31
8	4.550	103562	7517	2.20
9	4.860	62029	3846	1.32
10	5.288	15864	1182	0.34
11	5.492	20678	1154	0.44
12	5.925	35619	1012	0.76
13	7.082	36674	1503	0.78
14	8.071	13236	661	0.28
15	10.813	19805	630	0.42

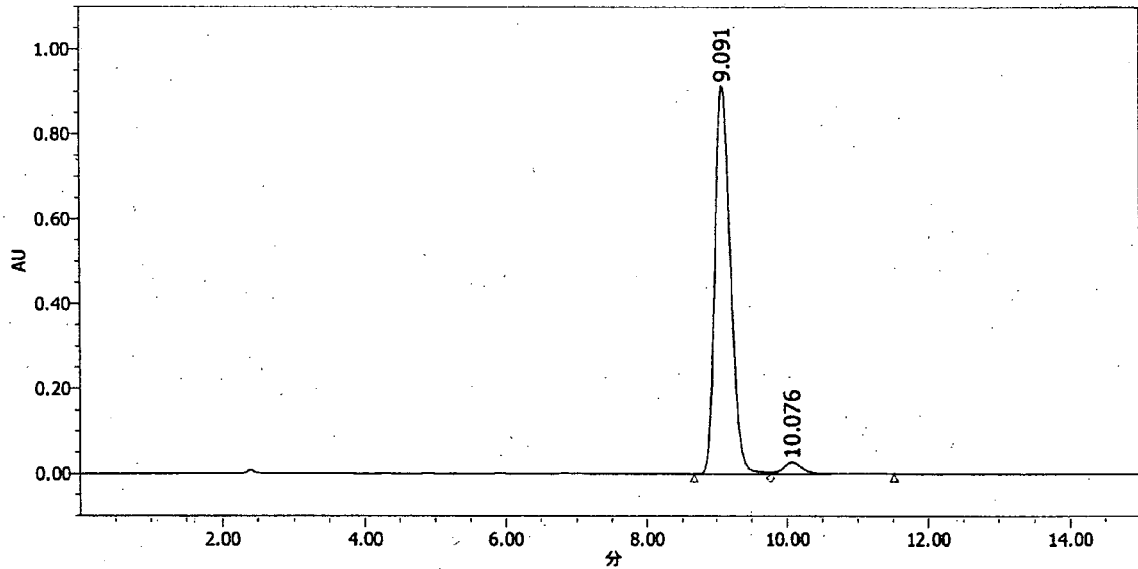
	保持時間 (分)	面積 ( $\mu$ V秒)	高さ ( $\mu$ V)	%面積
16	12.083	28541	1591	0.61
17	13.308	3503357	178355	74.58

図 4-3 アピエチン酸の HPLC クロマトグラム(22 日目、4°C)



	保持時間 (分)	面積 ( $\mu$ V秒)	高さ ( $\mu$ V)	%面積
1	9.091	14525574	956003	96.50
2	10.075	527450	27752	3.50

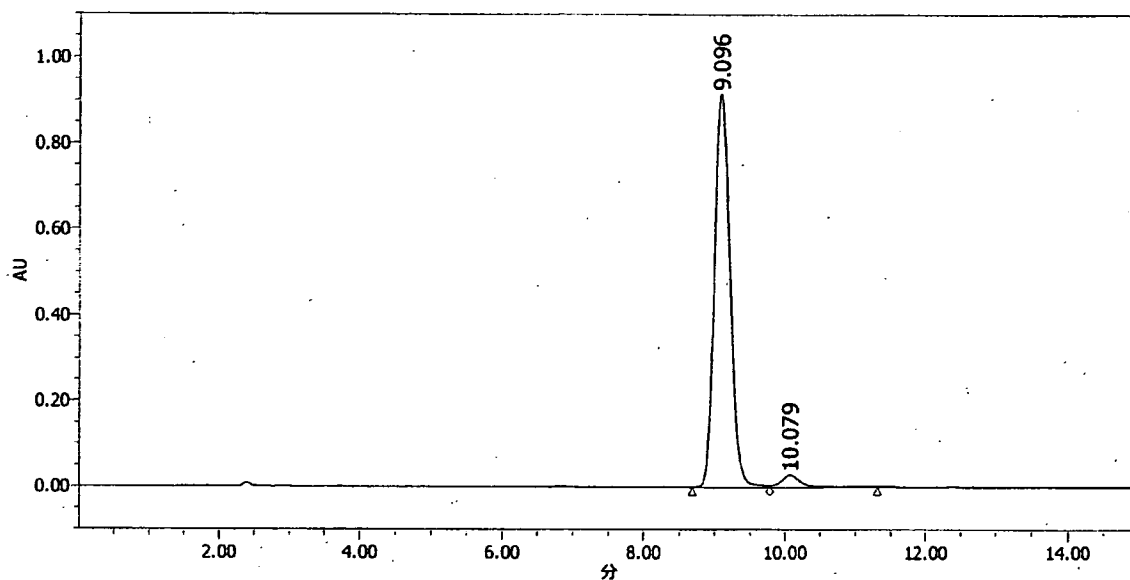
図 5-1 HCA の HPLC クロマトグラム(22 日目、104.0mg/L 標準液)



	保持時間 (分)	面積 ( $\mu$ V秒)	高さ ( $\mu$ V)	%面積
1	9.091	14032345	916076	96.38
2	10.076	527724	27239	3.62

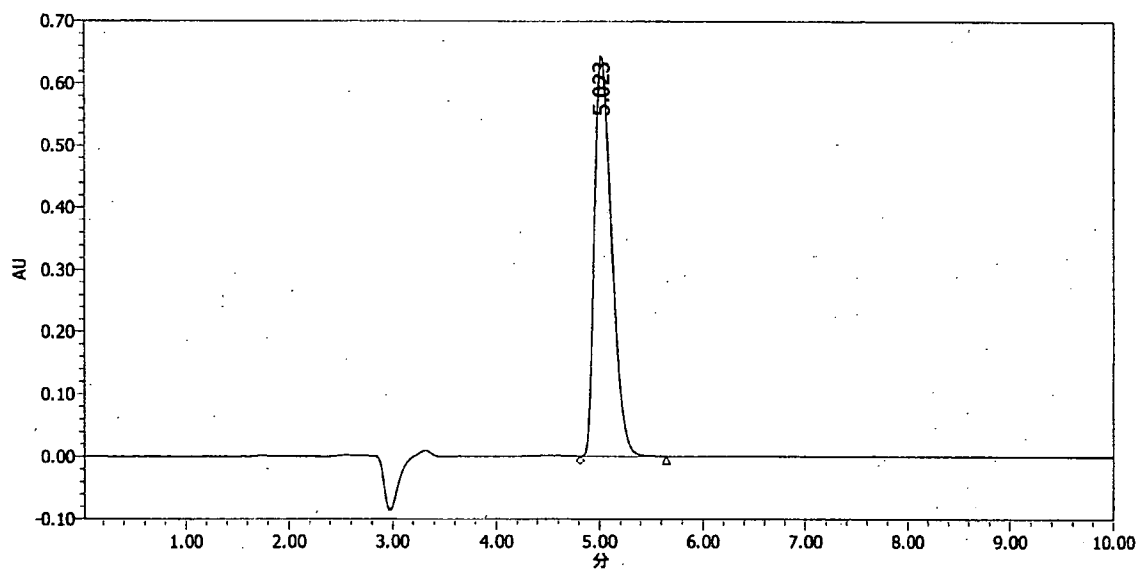
図 5-2 HCA の HPLC クロマトグラム(22 日目、25°C)





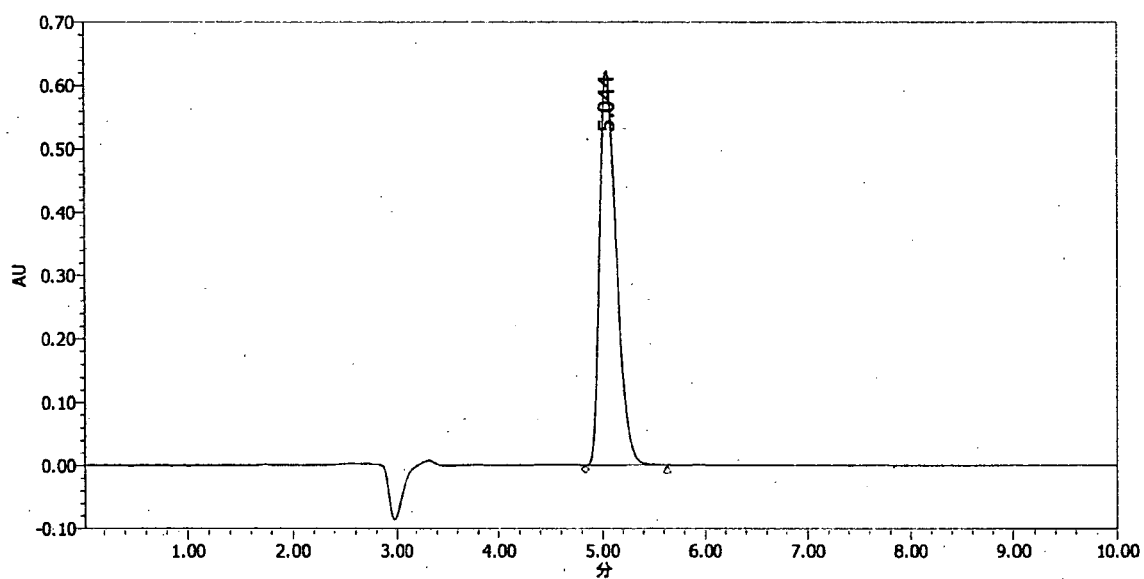
	保持時間 (分)	面積 ( $\mu$ V秒)	高さ ( $\mu$ V)	%面積
1	9.096	14034343	916932	96.35
2	10.079	531801	28128	3.65

図 5-3 HCA の HPLC クロマトグラム(22 日目、4°C)



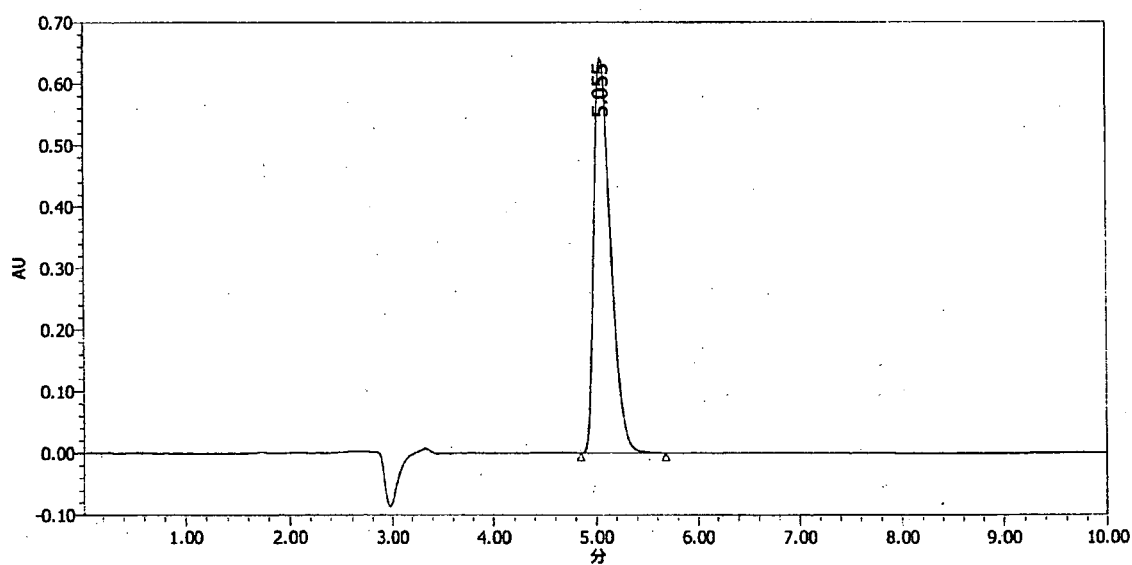
	保持時間 (分)	面積 ( $\mu$ V秒)	高さ ( $\mu$ V)	%面積
1	5.023	7396330	647096	100.00

図 6-1 3-AP の HPLC クロマトグラム(21 日目、99.4mg/L 標準液)



	保持時間 (分)	面積 ( $\mu$ V秒)	高さ ( $\mu$ V)	%面積
1	5.044	7131906	624283	100.00

図 6-2 3-AP の HPLC クロマトグラム(21 日目、25°C)



	保持時間 (分)	面積 ( $\mu$ V秒)	高さ ( $\mu$ V)	%面積
1	5.055	7351448	643428	100.00

図 6-3 3-AP の HPLC クロマトグラム(21 日目、4°C)

## 2007年 LLNA 評価委員会議事録(案)

日時：平成19年8月1日(水) 14:00-17:00

場所：国立衛研8号館 センター会議室

出席者：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)、萩野滋延(株式会社資生堂、品質保証センター代替法開発研究所)、大野泰雄(国立衛研)、手島玲子(国立衛研・機能生化学部)、

オブザーバー：大森 崇(京都大学大学院 医学研究科)、笛木 修(医薬品医療機器総合機構) 小島 肇(国立衛研・薬理部) 以上、順不同、敬称略

配布資料：

- 1) 評価委員会委員名簿
- 2) 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
- 3) LLNA-DA法バリデーション研究報告書(概括)
- 4) LLNA-DA法バリデーション研究(第1実験)報告書
- 5) LLNA-DA法バリデーション研究(第2実験)報告書
- 6) LLNA-DA法バリデーション研究結果報告(大森先生)：当日未配布

議題：

### 1. 委員の確認

2年ぶりの開催ということもあり、資料1をもとに小島オブザーバーが委員の所属を確認した。修正版リストを全員に送付するとされた。前回まで委員であった五十嵐、金澤、牧各先生はLLNA-DAバリデーション実行委員でもあり、これからの評価メンバーから外したとの説明が小島オブザーバーよりあった。

### 2. LLNA-DAの評価経緯

大野委員長が挨拶に引き続き、司会を務め議事を進めた。資料2 p11に示す評価委員会の見解をもとにバリデーションを日本動物実験代替法学会 バリデーション委員会に依頼したとの経緯説明がなされた。

### 3. LLNA-DAバリデーション報告

これを受け、現在のバリデーション委員長であり、LLNA-DAバリデーション実行委員長である大森オブザーバーより資料6をもとにバリデーションの実行内容について説明がなされた。バリデーション委員会の結論として、LLNA-DAは指標として用いた  $\exp(\tau^2)$  が1.2以下であることから再現性も高く、LLNAと同程度の検出力があるとまとめた。

質疑応答にて、

- 1) ATP測定器をすべて同一にした理由は何か？ これにより、今後の試験に用いる測定器がその測定器に限定されるのではないか？

回答：メーカーからデモ機を借用でき、新規購入者もいたことからたまたま同一メーカーで揃えることができた。機器の相違点を比較検討することは施設内で行えばよく、バリデーション研究ではできれば揃えたいと考えた(大森)。

- 2) 評価委員会による一次評価時には被験物質をブラインドで配布し、各施設で用時に希釈して投与することを想定していたと考えられる。このため、被験物質の物理的、化学的安定性については用時調製ということもあり、特に問題としなかったが、本バリデーション研究では被験物質を媒体に一定濃度に溶かしたものを配布したため、調製から投与までに日数が経過した。したがって、被験物質の物理的、化学的安定性について十分に考察する必要があったのではないか？

実際に報告書では、被験物質調製時には高濃度の硫酸ニッケルとアピエチン酸（2006/5/30 調製分）を除き、残り全ての被験物質が溶解していたのに対し、投与時には6物質で析出、沈殿が生じていた、と記載されている。また、「被験物質を入れた容器がプラスチックであったため、溶媒として acetone/olive oil (AOO)を用いると容器が溶ける可能性が示唆された」との記載がある。

バリデーションの結果について見ると、LLNA 法で陽性物質とされている 3-アミノフェノールは本研究による LLNA-DA 法では陰性となっている。調製時には溶解していた物質が投与時には3施設とも懸濁状態であり、そのことが原因となって陰性となった懸念を否定できないと考えられる。LLNA 法で陽性の塩化コバルトは3施設中1施設で LLNA-DA 法では陰性となっている。当該施設では投与時に沈殿が認められており、混ぜながら動物に適用されている。一方で、超音波処理をして溶解確認後に適用した施設では陽性となっている。また、懸濁適用したもう1施設では陽性が認められている。これも溶解や懸濁状態が原因となって陽性、陰性を分けた懸念を否定できないと考えられる。

LLNA 法で陰性である硫酸ニッケルについても、析出物を超音波処理して溶解確認後投与した施設で陽性を示し、懸濁適用した2施設では陽性あるいは陰性と結果が異なっていた。この場合も、溶解状態や懸濁状態が原因となって陽性、陰性を分けた懸念を否定できないと考えられる。

変質のない被験物質が試験施設に配布され投与に供されることにより、はじめて施設間再現性、LLNA との一致性の検討が可能となることから、調製から使用までの間の安定性に懸念がある物質の場合には慎重に評価を進める必要がある。

回答：被験物質を原体で送ると、施設毎に溶媒、用量などの選択がばらばらになり、結果の解釈が難しくなるとともに、濃度設定試験のための予備試験が必要となり使用動物数が増える。動物数の増加は経費的にも、愛護の面でも問題であることから事前調製法を選択した（大森）。

DMSO 調製物を冷蔵で保存すれば析出がでる。施設によって保存場所、温度が異なり、析出があっても、均一懸濁を心掛け、適切な対処が施設毎に行われると考えた（小島）。

- 3) 評価委員会からの助言である「濃度設定は公比 10 の 3 濃度で行うのがよい」という事に対し、なぜそれを不適切と判断したのかが報告書に書かれていない。必ずしも評価委員会の助言を守らなくても良いが、それに比べてどう優れているのかを説明してほしい。

評価委員会は被験物質をブラインドで配布し各施設で用時に希釈して投与することを前提にバリデーション可能な動物数を考慮して、各被験物質について濃度ごとの SI 値が得られ、さらに少なくとも感作性の陽性、陰性あるいはカテゴリー（negative, weak, moderate・・・）を求めることができるであろう「公比 10、3 濃度」を基本に詳細なプロトコールをつめるよう助言したと認識している。

回答：被験物質選定グループでは種々の視点から物質および用量を絞り込んだと認識している（大森）。

- 4) 2 回目実験の目的は 1 回目の追試か？

回答：金属の結果が 1 回目ではばらつき、その再現性を確認したかったこともあるが、経験のない施設による transferability の検討もその理由である（大森）。

- 5) 硫酸ニッケルは LLNA 法陽性との報告（Food Chem. Toxicol. 40,1719-1725, 2002）もあることか