

3.4.3 BrdU取り込み量 (吸光度)	
3.5 LLNA-BrdU の分析感度.....	24
3.6 各被験物質の用量反応関係.....	24
3.7 施設内再現性	26
3.8 施設間再現性	26
3.9 代替可能性.....	27
4. 考察.....	28
4.1 本研究の位置付け.....	28
4.2 本研究の妥当性.....	28
4.2.1 本研究で評価したLLNA-BrdU 法の特徴	
4.2.2 被験物質の選択	
4.2.3 試験法の普及	
4.2.4 データの質に関して	
4.2.5 本研究の判定基準の変更について	
4.3 個々の被験物質に対する考察.....	31
4.4 評価委員会からの提言とその対応.....	31
5. 結論.....	32
謝辞.....	32
参考文献.....	32

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-BrdU法バリデーション研究実行委員会(以後、LLNA-BrdUバリ実行委と記す)が実施したバリデーション研究報告書である。

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 (Guinea-pig maximization test および Buehler test) の代替法として広く知られている。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。しかしながら、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。LLNA-BrdU法は、³H-thymidine の取り込み量の代わりに bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込み量を指標として判定する方法であり、RI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。我々は過去に、施設間再現性と代替可能性の検討を主目的とし、9施設で12被験物質を用いてLLNA-BrdU法のキャッチアップバリデーション研究を実施した。その結果、実施したLLNA法と比較して陽性対照物質のバラツキが大きく、試験法の改良が必要であると結論された。そこで、Standard operating procedure (SOP) を改訂し、7施設で10被験物質を用いて第2次バリデーション実験を行った。

【方法】本研究はLLNA-BrdU法の改訂SOPに基づいて実施した。陽性対照物質 (50% hexyl cinnamic aldehyde : HCA) 以外の10の被験物質のうち、3物質は全7施設で、残りの7物質は3施設毎に評価した。各被験物質をコード化し、3用量を秤量し各実験施設に送付した。各実験施設において、溶媒にて用事調製した被験物質を用いて実験がなされた。溶媒対照群のBrdUと取り込み量に対する被験物質群のBrdU取り込み量の比 (Stimulation index, SI値) が2を超えた場合、陽性と判定した。

【結果と考察】改訂SOPで規定していた実験の成立条件は厳しすぎたため、その遵守は難しかった。このため、より広くLLNA-BrdU法が使用できるようにするために成立条件を緩和した解析結果に基づき検討を行った。その結果、全施設で評価した陽性対照物質HCAのSI値のバラツキは小さく、施設内再現性も高かった。この結果により、緩和した実験成立条件下でSOPの改良を確認できたといえる。実験に用いたすべての被験物質の結果を解析した結果、濃度依存性および施設間再現性も高く、LLNA法との結果とほとんど一致した。

【結論】本研究で得られた結果から、LLNA-BrdU法は施設間再現性がよく、LLNA法と同程度に代替可能性が高い試験法であるといえる。

1. 背景および目的

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リンパ球による接触部位に一致して炎症反応をきたした現象をいう。ACDは医薬品、産業で 사용되는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の関連性が知られている。このため、化学物質の感作性は安全性評価において重要である。

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法としては、モルモットを用いた試験であるGuinea-pig maximization test (GPMT法) およびBuehler test (BT法) が長い間利用されてきた (OECD, 1992)。これらの試験法では、化学物質により感作を誘導し、一定期間後、惹起処置による皮膚反応の観察により感作性を評価する。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により感作を誘導するが、BT法ではFCAを用いず、被験物質の皮膚への繰り返し塗布により感作を誘導する。

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 (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)。

しかし、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。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-BrdU法

財団法人 化学物質評価機構 (以後、化評研) は、³H-thymidineの代わりにBrdU (Bromodeoxyuridine) の取り込み量によりリンパ細胞増殖を検出する指標としたLLNA-BrdU法を開発した (Takeyoshiら, 20001)。

1.5 本研究にいたるまでの過程

化評研は、LLNA-BrdU法の動物実験代替法としての確立を目的とし、厚生労働科学研究班 (主任研究者 大野泰雄) に評価を依頼した。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、かつ時間のかからず、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-BrdU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がLLNA-BrdU法バリデーション研究実行委員会 (以下、LLNA-BrdUバリ実行委) を組織させ、この実行委員会がバリデーション研究を実施した。その結果は、実験終了後の2007年2月9日の第3回LLNA-BrdUバリ実行委で示された。実施した12の被験物質の濃度範囲で得られた陽性対照物質の結果はLLNA

法と比較してバラツキが大きく、試験法の改良が必要であると結論された。以後、この実験をLLNA-BrdU第1次バリデーション実験（以後、第1次バリ実験）と定義し、Standard operating procedure (SOP) を改良して実施する実験をLLNA-BrdU第2次バリデーション実験（以後、第2次バリ実験）と定義する。本報告書はこの第2次バリ実験をまとめたものである。

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

本研究の研究計画には、以下の目的を含む皮膚感受性試験代替法（LLNA-BrdU法）第2次バリデーション研究計画書（LLNA-BrdU法第2次バリ研究計画：資料1）に従い実施された。

本研究の目的は、LLNA-BrdU法第2次バリ実験を被験物質の盲検下で実施したときにおける、以下の3点の多施設での実験による評価である。

- 1) 複数の施設間でどの程度一致するか（施設間再現性）
- 2) LLNA-BrdU第1次バリデーション実験の改善が妥当か
- 3) 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）

なお、3)の目的に対しては、LLNA-BrdU法とGPMT/BT法との代替可能性の一致性についての検討も含めた。

2. 方法

2.1 組織と役割

2.1.1 研究の組織

本研究を遂行するための研究組織、LLNA-BrdU法第2次バリデーション研究実行委員会（以下、LLNA-BrdU 第2次バリ実行委）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募集したバリデーション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。

第1次バリ実験に参加した9施設のうち、化学物質評価研究機構、明治製菓株式会社は都合で第2次バリデーション研究の実験を辞退した。したがって、7施設の代表者がLLNA-BrdU 第2次バリ実行委として本研究に参加した。ただし、提案施設である化評研の代表者は、第2次バリ実行委の技術担当者として研究に参加した。

LLNA-BrdUバリ実行委を資料2「LLNA-BrdU第2次バリ実行委」に、実験参加施設およびその実験担当者を資料3「LLNA-BrdU 第2次バリ実行委担当者一覧」に示す。

2.1.2 各組織の役割

LLNA-BrdU第2次バリ実行委の中にいくつかの担当を設けた。担当および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：LLNA-BrdU法の内容、SOP、記録用紙等の説明を行い、問い合わせに対応する。

被験物質選定担当者：資料4「バリ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。

動物手配担当者：実験用動物の注文・搬入を手配する。

試料等手配担当者：割付デザインとSOPに従って被験物質を計量し、コード化して実験参加施設に関連する資料と共に送付する。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、データを解析する。中間報告会では、解析結果をまとめて報告する。

2.2 LLNA-BrdUの操作法

資料1「LLNA-BrdU 法第2次バリ研究計画」にもとづいて、この研究用にLLNA-BrdUバリ実行委がSOPを作成した。このSOPの最終版は資料5「LLNA-BrdU 法実験SOP Ver. 1.02」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：雌性の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（50% hexyl cinnamic aldehyde/A00溶

液), 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: 盲検下で送付,

被験物質: 被験物質をコード化し, 3用量を秤量し各実験施設に送付, 各施設で用事調製

測定指標: BrdU測定キットを用い, 吸光度でBrdU取り込み量を測定

試験操作: 図1に概略を示す.

- ① 両耳介に被験物質を3日間続けて塗布する.
- ② 最終感作の約48時間後に, BrdU生理食塩水溶液(5mg/mL) 0.5mLを腹腔内投与する.
- ③ BrdU投与の約24時間後に, リンパ節を採取する.
- ④ 予め, 各試験施設において実施された予備実験の結果に基づき, 陰性対照ウエルの吸光度が0.1~0.2となる細胞浮遊液の容量を決定する.
- ⑤ リンパ節をつぶし, プラスチック容器に④で決めた容量の生理食塩液を加えて均一な細胞浮遊液を作製し, 1個体あたり3穴に分注する. BrdU測定キットを用い, マイクロプレートリーダーによる吸光度を測定する. この値が0.2を超える場合には細胞浮遊液の冷蔵保存液を翌日以降希釈して, 再測定に用いる.

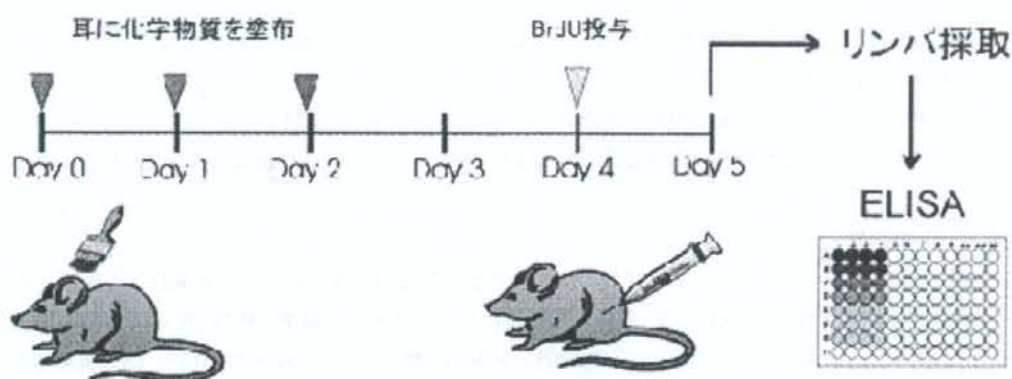


図1. LLNA-BrdU操作法

1回に実施する被験物質数: 1回の操作で2被験物質および陽性対照物質を実施する.

結果の評価: 試験群毎に平均吸光度を求め, 陰性対照群の吸光度に対する比(Stimulation Index, SI)を算出した後, 各用量群の平均SI値を算出する. 被験物質投与群のSI値の平均値が2を超える場合を陽性と判定する.

2.3 操作法の普及と改良

2.3.1 技術研修会

各実験施設の実験担当者がLLNA-BrdU法の原理と操作法を理解できるように第1次バリ実験の前に技術研修会を実施した. 実験実施施設は第1次バリ実験と同じであるため, 第2次バリ実験のための技術研修は行わなかった.

2.3.2 予備実験

第1次バリ実験では, 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, 予備実験の実施を実施した. 第2次バリ実験では各施設が実験経験を有するために予備実験は実施しなかった.

2.3.3 第1次バリ実験によって生じたSOPの問題点および追加実験による改訂

第1次バリ実験のSOPでは溶媒群での平均吸光度が0.2を超える場合には細胞浮遊液を希釈して再測定すると決めていたが、ブランク値を差し引くことおよび下限は決めていなかった。このため希釈しすぎた場合には、細胞がなくなり吸光度が0に近い値を取る施設が現れた。SI値は、被験物質群と溶媒群のBrdU量取り込み量の比で定義されるので、溶媒群の吸光度が0に近くなると、極端に大きな値をとった。これが第1次バリ実験で、陽性対照物質と被験物質において施設間差の大きかった一因であると考えられた。

原因追求のため、一部の施設で追加実験が行われ、2007年6月28日の第4回LLNA-BrdUバリ実行委および2007年8月23日の第5回LLNA-BrdUバリ実行委にて、それらの経験を受けて議論した。結果として、特に以下の点についての対応を決定した。

- ① 生理食塩液の容量は実施施設で事前に至適条件を検討の後、陰性対照ウェルの吸光度が0.1~0.2となる条件を採用する。この範囲内を実験の成立条件とする。
- ② A00群または溶媒群の平均吸光度が0.2を超えた場合には細胞浮遊液を更に希釈し、再測定する。0.1を下回った場合には解析対象から外す。なお、予め数段階の希釈浮遊液(5~15mLの浮遊液を調製し、生理食塩液で希釈した浮遊液)を調製し、同時に測定しても構わないが、その際には実験成立条件を満たす1データのみを採用する。
- ③ 吸光度測定の際に3ウェルに生理食塩水を加え、Blankとする。このBlankを測定値から差し引く。また、以下に示す合意を得た。
- ④ リンパ節の潰し方により吸光度値が異なったため、丁寧に細胞浮遊液を調製する。
- ⑤ 実験者から上がってきた試験操作法の問題点(BrdU腹腔内投与、洗浄・乾燥操作など)もSOPに追記する

2.4 被験物質および溶媒

本研究は盲検下での実施が決まっていたので、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した。被験物質の候補リストを資料4「バリ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、皮膚感作性の程度およびバランスを考慮して最終的に10被験物質を選択した。選択にあたっては、すでに公開されている第1次実験の被験物質から一部を変更し、ECVAM performance standard (Basketter, 2008) から得られた情報をもとにした。選択された被験物質は、LLNAの結果を参考に3濃度を設定した。これらの被験物質は各濃度に秤量された後に遮蔽化され、調製する溶媒とともに各実験施設に送付された。ただし、2,4-dinitrochlorobenzeneについては、低濃度での適用もあり正確な秤量ができないと予想された。そこで、2,4-dinitrochlorobenzeneの10%A00溶液を原液として用いて秤量した。送付された被験物質およびコード記号一覧を表1として示す。

溶媒としてアセトン(和光純薬工業株式会社、東京、純度99.5%、Lot. DPR1014)、オリーブ油(和光純薬工業株式会社、Lot. WKL1049)、ジメチルスルフォキシド(DMSO:和光純薬工業株式会社、純度99%、Lot. LTQ5318)を用いた。オリーブ油はこのバリレーション研究開始時に開封した。

2.4.1 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した。1回の試験で2種の被験物質について実施し、それらの溶媒は共通となるように割付した。

被験物質割付担当者は、表2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。

2.4.2 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計量し、実験参加施設に配布した。動物手配担当者は、各実験施設と打ち合わせを行い、動物搬入を手配した。配布された被験物質のリストを表1に示す。

表1. LLNA-BrdU法バリデーション研究の被験物質リスト

Code	No.	Substance name	Solvent	Classification※	Dose (%)			Manufacture	Purity (%)	Lot.
B	1	Isopropanol (2-Propanol)	A00	Negative	10	25	50	Wako Pure Chemical Industries Ltd	99.9	ASF8123
H	2	Hexylcinnamic aldehyde (Hexylcinnamal, α -Hexylcinnamaldehyde)	A00	Moderate	10	25	50	Wako Pure Chemical Industries Ltd	97	LAQ5834
E	3	2,4-Dinitrochlorobenzene (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene)	A00	Extreme	0.1	0.3	1	Wako Pure Chemical Industries Ltd	99	EWB5685
G	4	Methyl salicylate	A00	Negative	10	25	50	Wako Pure Chemical Industries Ltd	98	EWB6518
A	5	Nickel sulfate (Nickel(II) sulfate hexahydrate)	DMSO	False Negative	1	3	10	Wako Pure Chemical Industries Ltd	99-102	SDN0275
D	6	trans-Cinnamic aldehyde	A00	Moderate	1	3	10	Kanto Chemical Industries Ltd		709W2149
C	7	Eugenol	A00	Weak	10	25	50	Wako Pure Chemical Industries Ltd	95	TSK3738
F	8	Glutaraldehyde solution (ab. 25%)	ACE	Extreme	0.1	0.3	1	Wako Pure Chemical Industries Ltd	25	EWG0243
J	9	Formaldehyde solution (36~ 38%)	ACE	Strong	1	3	10	Wako Pure Chemical Industries Ltd	36-38	EWB7698
I	10	L-Lactic acid	DMSO	Negative	10	25	50	Wako Pure Chemical Industries Ltd	85-92	PKJ7904

* 文献参照: Haneke ら (2001) および Gerberick ら (2004)

表2. 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			○	○
...				...

2.5 実験実施のスケジュール

平成19年9月～12月にかけて各施設が実験スケジュールを立て、実験した（資料6）。

2.6 データの管理

2.6.1 記録用紙

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（資料7「LLNA-BrdUバリデーション研究記録用紙」）に記録した。

実験担当者は、以下の記録・結果を所定の記録用紙に記録する。

- (1) 被験物質、溶媒、陽性対照物質溶液
- (2) 被験物質使用記録
- (3) 動物の入荷、管理、群分けに関する記録
- (4) 投与記録および観察記録
- (5) 使用試薬、キットに関する記録
- (6) 体重測定結果
- (7) リンパ節重量測定結果
- (8) BrdU取り込み量(吸光度)測定結果

2.6.2 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、BrdU量）を入力するデータシート（資料8「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のファイルが送付され、実験担当者は実験の測定結果を入力した。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。

2.6.3 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。

2.6.4 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および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。

2.7 データ解析の方法

2.7.1 体重、リンパ節重量、BrdU取り込み量

体重(1日目と6日目)、リンパ節重量、BrdU取り込み量は基本統計量(平均、標準偏差など)を算出した。BrdU取り込み量は1個体あたり3穴の測定値が得られるが、それらの平均値を求め解析に用いた。

2.7.2 SI値とその95%信頼区間の算出

主なデータ解析は、被験物質群または陽性対照群の溶媒対照群に対する吸光度の比(SI値)に基づき実施した。SI値は、個々の実験の用量毎にひとつの値が得られる。SI値の近似的な95%信頼区間は、資料9「SI値とその95%信頼区間の計算法」に示す方法により得た。

2.7.3 SI値に基づく判定

採用された実験において、濃度依存的に正の傾きでSI値が2を超えた場合を陽性、そうでない場合を陰性と判定した。

2.7.4 施設内再現性、施設間再現性の評価

施設内再現性、施設間再現性は、SI値の値の大きさとそれに基づく陽性と陰性の判定により評価した。

2.7.5 代替可能性の検討

代替可能性の指標として、GPMT法もしくはBT法による判定(Guinea-pig maximization testおよびBuehler test、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実施している。このため、同一物質の判定は、個々の濃度について算出されたSI値の重み付平均が濃度依存的に正の傾きでSI値が2を超えた場合を陽性、そうでない場合を陰性とする判定に基づいた。

以上の解析には、SAS version 9を用いた。

3. 結果

3.1 選択された被験物質と割付け結果

表3に各施設への被験物質の割付結果を示す。基本的には1施設あたり6被験物質を実施した。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。

表3. 割り付けられた被験物質とその実験順序

施設番号	第1期		第2期		第3期	
	4~6群	7~9群	4~6群	7~9群	4~6群	7~9群
1	4 (G)	3 (E)	2 (H)	1 (B)	8 (F)	9 (J)
2	2 (H)	1 (B)	3 (E)	6 (D)	7 (C)	4 (G)
3	4 (G)	3 (E)	2 (H)	1 (B)	10 (I)	5 (A)
4	3 (E)	6 (D)	1 (B)	2 (H)	10 (I)	5 (A)
5	9 (J)	8 (F)	3 (E)	6 (D)	1 (B)	2 (H)
6	2 (H)	1 (B)	8 (F)	9 (J)	7 (C)	3 (E)
7	2 (H)	1 (B)	7 (C)	3 (E)	10 (I)	5 (A)

3.2 研究の質について

研究の質を確保するために、以下を実施した。

- ・ 記録用紙のチェック

すべての記録用紙を確認し、不備については後日問い合わせ確認した。

- ・ データクリーニング

実験担当者は、実験中に測定した吸光度などを、データシートをプリントアウトしたものに書き込み、後に電子ファイルのデータシートに入力した。データ解析担当者は、測定値を記入したプリントアウトを集め、入力された電子ファイルのデータシート値との整合性を確認した。値が異なった場合、各施設へ問い合わせ、最終的な値を決めた。

- ・ 技術移転および予備試験の実施

- ・ 計画書、SOP の改訂経過の記録

3.3 データの取り扱いについて

3.3.1 析出、沈殿等について

被験物質調製時に析出や沈殿のないように超音波処理やボルテックスミキサーを用いて調製し、溶液でない場合の均一塗布を記録用紙で確認した。

3.3.2 採用基準の遵守と解析データセット

前述したように第2次バリ実験では、

- ・ プレート毎に陰性対照ウェルの吸光度0.1~0.2の範囲を実験の成立条件とする。

- ・ A00群または溶媒群の平均吸光度が0.2を超えた場合には細胞浮遊液を更に希釈後、再測定する。

と決められていた。陽性対照物質群および被験物質群についてこの基準の採否を示したものをデータ採否(1)として表4(左)、表5(左)にそれぞれ示すとともに、表6に内訳をまとめた。これらの表からわかるように、この基準を満足するのは、陽性対照群では21実験中14実験(66.7%)、被験物質群では42実験中24実

験 (57.1%) のみとなった。2008年2月15日の第6回 LLNA-BrdU 第2次バリ実行委では、この結果を踏まえて、再度採用基準について検討した。そこでは以下に示す意見が得られた。

- ・ 予備試験で条件を決めても、本試験でその条件に適合しない場合もあり、溶媒の吸光度 0.1~0.2 は厳しすぎる。
- ・ この基準を絶えず満たすことは実技的に難しい、本来はリンパ節重量毎に液量を決めるべきである。
- ・ 吸光度が範囲外になった場合、希釈しても細胞浮遊液の倍率通りにならず、必ずしも理論的な値が得られない。希釈により誤差が大きくなるのではないだろうか、本方法は、希釈によって再測定が可能である利点を持つとされているが、これがバラツキを大きくし、結果として施設間差を大きくしているようである。

これを踏まえ LLNA-BrdU 第2次バリ実行委員会では、吸光度の範囲を緩和し、1回目の測定結果を採用し、希釈後の再測定データは用いないことにした。また、陽性対照物質 HCA 50%濃度における SI 値が 2 以上でない場合には、被験物質の SI 値は正確に求められないと判断することにし、後の解析に採用しないことを決定した。以後の解析はこの新たな基準よっている。この基準を採用した場合の陽性対照群、被験物質群での採否を示したものを、データ採否 (2) として表 4 (右) および表 5 (右) に示した。また、表 6 にはまとめた実験数を示した。この基準を満足するのは、陽性対照群では 21 実験中 20 実験 (95.2%)、被験物質群では 42 実験中 40 実験 (95.2%) となった。

なお、希釈・再実験の実施状況は添付資料とした。

表 4. 陽性対照物質のデータ採否

コード	データ採否 (1)							データ採否 (2)						
	施設番号							施設番号						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
第1期	×	×	○	×	○	○	△	○	×	○	○	○	○	○
第2期	○	○	○	△	○	○	△	○	○	○	○	○	○	○
第3期	○	○	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

データ採否 (1) : 吸光度 0.1~0.2、希釈・再実験データの使用

データ採否 (2) : 吸光度の制限なし、希釈・再実験データの使用なし

○ : 採用, △ : 非実施による不採用, × : 適合外による不採用

表5. 被験物質のデータ採否

被験物質 コード	感作性*	データ採否(1)							データ採否(2)								
		施設番号							施設番号								
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7		
A	-			×	△			○			○	○				○	
B	-	○	×	○	△	△	△	○	○	×	○	○	○	○	○	○	
C	+		○					○	○		○					○	○
D	+		○		×	○				○		○	○				
E	+	×	○	○	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
F	+	○				△	○		○					○	○		
G	-	×	○	○					○	○	○						
H	+	○	×	○	△	△	△	○	○	×	○	○	○	○	○	○	
I	-			×	△			○			○	○				○	
J	+	○				△	○		○					○	○		

* LLNA 法の評価結果に基づく感作性の判定

データ採否(1): 吸光度 0.1~0.2, 希釈・再実験データの使用

データ採否(2): 吸光度の制限なし, 希釈・再実験データの使用なし

○: 採用, △: 非実施による不採用, ×: 適合外による不採用

表6. データ採否の内訳

	データ採否(1)			データ採否(2)		
	採用	不採用	合計	採用	不採用	合計
陽性対照	14 (66.7)	7	21	20 (95.2)	1	21
被験物質	24 (57.1)	18	42	40 (95.2)	2	42
合計	38 (60.3)	25	63	60 (95.2)	3	63

△, ×は不採用として計数

3.3.3 解析の方針

データ採否(2)の基準を満たすデータを対象とした解析を「主解析」、データ採否(1)の基準を満たすデータを対象とした解析を「副次解析」とする。以後、主解析を用いた結果を表や図に示す。ただし、背景基礎データの基本等計量について、これらの区別はない。

主解析および副次解析の解析対象データの一覧を表7に示す。標柱の「×」はデータ採否の基準を満たすデータが存在しないことを表す。なお、副次解析の結果は付録として添付した(資料10)。

表7. 解析対象データ

施設	時期	主解析	副次解析 (陽性対照)	副次解析 (被験物質)
1	第1期	1回目	×	×
	第2期	1回目	再測定	1回目
	第3期	1回目	再測定	1回目
2	第1期	×	×	×
	第2期	1回目	1回目	1回目
	第3期	1回目	1回目	1回目
3	第1期	1回目	再測定	再測定
	第2期	1回目	再測定	再々測定
	第3期	1回目	×	×
4	第1期	1回目	×	×
	第2期	1回目	×	×
	第3期	1回目	1回目	×
5	第1期	1回目	1回目	×
	第2期	1回目	1回目	1回目
	第3期	1回目	1回目	×
6	第1期	1回目	1回目	×
	第2期	1回目	1回目	1回目
	第3期	1回目	再測定	再測定
7	第1期	1回目	×	1回目
	第2期	1回目	×	1回目
	第3期	1回目	1回目	1回目

3.4 背景基礎データ

3.4.1 体重

実験開始1日目、6日目の動物の体重の基本統計量をそれぞれ表7および表8に示す。施設によっては1日目に比べ6日目の体重が増えていない施設もあったが、全体として施設間の大きな変動はみられなかった。

なお、施設6で検疫・馴化期間中に5匹が事故死したため、次の4条件でそれぞれ欠測が生じた。

- ・被験物質H 高濃度
- ・被験物質B 低濃度
- ・被験物質B 中濃度
- ・被験物質B 高濃度

表 8. 1日目および6日目の体重の基本統計量

17JUL2008:17:36:16

Summary statistics of the body weight (g) at day 1 (wstat_w1.txt)

Labo. ID	n	Mean	SD	Min	25%	Median	75%	Max
1	108	22.2	1.38	18.4	21.40	22.00	23.2	25.8
2	108	22.6	1.32	20.1	21.70	22.70	23.5	25.9
3	108	22.1	1.38	19.3	21.00	22.00	23.0	26.2
4	108	21.8	1.44	17.6	21.00	21.70	22.7	25.9
5	108	22.6	1.25	19.6	21.75	22.70	23.4	25.2
6	104	22.0	1.30	19.7	21.00	21.80	22.9	25.3
7	108	22.1	1.55	18.9	21.00	21.85	23.1	27.8

17JUL2008:17:36:16

Summary statistics of the body weight (g) at day 6 (wstat_w6.txt)

Labo. ID	n	Mean	SD	Min	25%	Median	75%	Max
1	108	22.6	1.48	18.7	21.50	22.40	23.45	26.4
2	108	23.8	1.52	20.6	22.55	23.80	24.55	28.0
3	108	23.1	1.48	20.0	22.10	23.00	24.15	27.0
4	108	22.4	1.57	18.1	21.30	22.35	23.60	26.1
5	108	22.8	1.36	19.7	21.70	22.80	23.85	26.0
6	104	22.0	1.27	19.0	21.00	22.05	22.95	24.8
7	108	22.9	1.42	19.7	21.75	22.80	24.00	26.3

3.4.2 リンパ節重量

リンパ節重量の基本統計量を表9に示す。被験物質の影響が強いほどリンパ節重量は増加した。

表9. リンパ節重量の基本統計量

17JUL2008:17:36:16

Summary statistics of the lymph node weight (mg) (lymwstat.txt)

Chemical	n	Mean	SD	Min	Median	Max
Vehicle (for PC)	84	3.5	0.67	1.4	3.60	5.8
Positive control	84	7.5	1.28	5.1	7.70	10.6
Vehicle (for test chemical)	84	3.8	0.91	2.2	3.70	6.9
A (Low)	12	5.0	1.11	3.5	4.80	7.3
A (Mid)	12	5.4	1.07	3.9	5.30	7.5
A (High)	12	5.7	1.10	4.4	5.45	7.6
B (Low)	27	3.5	0.79	1.8	3.50	5.5
B (Mid)	27	3.3	0.68	2.0	3.10	4.7
B (High)	27	3.3	0.62	2.4	3.10	5.0
C (Low)	12	4.7	1.15	3.1	4.40	6.6
C (Mid)	12	7.3	1.86	3.7	7.20	10.5
C (High)	12	8.6	0.90	7.2	8.80	10.0
D (Low)	12	3.7	0.57	2.7	3.65	4.6
D (Mid)	12	5.3	0.52	4.5	5.25	6.0
D (High)	12	7.3	1.10	5.9	7.10	9.5
E (Low)	28	8.3	1.70	5.8	8.05	12.9
E (Mid)	28	15.4	2.38	9.7	15.70	20.0
E (High)	28	21.5	2.67	16.8	22.15	25.9
F (Low)	12	3.7	0.63	2.8	3.50	4.7
F (Mid)	12	5.5	1.04	3.3	5.70	7.2
F (High)	12	6.6	1.49	3.5	6.90	8.5
G (Low)	12	3.8	0.36	3.3	3.75	4.5
G (Mid)	12	3.9	0.65	2.8	3.80	5.1
G (High)	12	4.2	0.56	3.3	4.20	5.1
H (Low)	28	4.7	1.03	3.0	4.35	6.9
H (Mid)	28	6.5	1.06	4.7	6.35	8.5
H (High)	27	7.7	1.53	4.9	7.70	10.7
I (Low)	12	4.2	0.61	3.2	4.15	5.1
I (Mid)	12	5.4	1.08	3.4	5.45	6.8
I (High)	12	5.2	1.19	3.6	4.90	8.0
J (Low)	12	4.5	1.17	2.1	4.60	6.4
J (Mid)	12	4.8	1.40	2.7	4.60	7.0
J (High)	12	5.5	1.09	3.7	5.75	7.1

3.4.3 BrdU取り込み量 (吸光度)

陽性対照物質, その溶媒のBrdU取り込み量 (吸光度) およびSI値を図3および表10に示す. 溶媒の測定値の平均値が0に近くなると, SI値が極端に大きくなる現象が生じる. 表10に示すように, 各実験で溶媒群内の個々の測定値が0.05より低い場合もあったが, 表11に示すように, 最小値が0.05以上であり, 最大値は0.32までに入っていた.

各被験物質, その溶媒のBrdU取り込み量 (吸光度) およびSI値を表12にすべて示した.

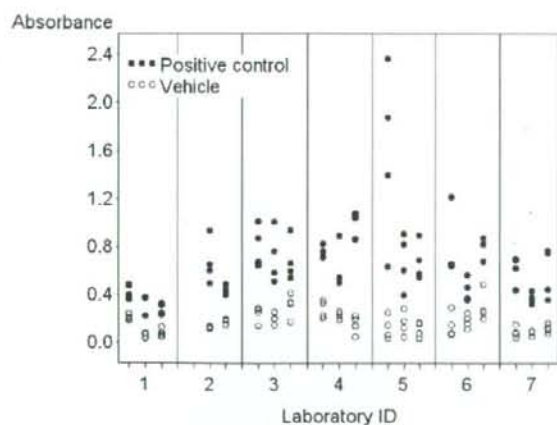


図3. 各施設のBrdU取り込み量（吸光度の分布）

表10. 溶媒対照の施設・時期毎の吸光度の群内平均、SI値とその95%信頼区間

17JUL2008:17:36:17

Mean absorbency of the positive control (SI_PC2.txt)
Data criterion 2

Labo. ID	Term	Vehicle mean absorbance	PC mean absorbance	SI	95%CI lower	95%CI upper
1	1	0.209	0.432	2.07	1.72	2.48
	2	0.055	0.337	6.11	3.79	9.85
	3	0.082	0.282	3.43	2.15	5.48
2	2	0.131	0.677	5.15	3.91	6.79
	3	0.174	0.438	2.52	2.14	2.97
3	1	0.241	0.804	3.34	2.37	4.70
	2	0.203	0.720	3.54	2.45	5.11
	3	0.316	0.689	2.18	1.46	3.25
4	1	0.281	0.756	2.69	2.07	3.51
	2	0.224	0.710	3.17	2.28	4.41
	3	0.154	1.012	6.58	3.96	10.91
5	1	0.126	1.569	12.46	5.14	30.17
	2	0.161	0.683	4.24	2.12	8.46
	3	0.112	0.678	6.07	3.34	11.05
6	1	0.150	0.793	5.30	2.48	11.30
	2	0.183	0.440	2.41	1.67	3.47
	3	0.304	0.765	2.52	1.64	3.87
7	1	0.089	0.614	6.86	4.02	11.72
	2	0.085	0.372	4.39	3.31	5.82
	3	0.122	0.581	4.78	3.05	7.50

表11: 溶媒吸光度の群内平均の基本統計量

n	平均	標準偏差	最小値	中央値	最大値
20	0.1701	0.0750	0.055	0.158	0.316

表12. 各被験物質の施設・時期毎の吸光度の群内平均、SI値とその95%信頼区間

25JUL2008:16:32:31

Mean absorbance and SI value (SI_sub_A.txt)

Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance	Mean absorbance	95%CI SI	95%CI lower	95%CI upper
				for vehicle	for chemical			
A	3	Low	4	0.221	0.303	1.37	0.80	2.38
	3	Mid	4	0.221	0.424	1.92	1.24	2.96
	3	High	4	0.221	0.570	2.58	1.81	3.68
	4	Low	4	0.210	0.431	2.05	1.24	3.38
	4	Mid	4	0.210	0.420	2.00	1.19	3.36
	4	High	4	0.210	0.952	4.53	2.56	8.00
	7	Low	4	0.145	0.273	1.88	1.31	2.71
	7	Mid	4	0.145	0.386	2.66	1.67	4.24
	7	High	4	0.145	0.385	2.66	1.65	4.28

25JUL2008:16:32:31

Mean absorbance and SI value (SI_sub_B.txt)

Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance	Mean absorbance	95%CI SI	95%CI lower	95%CI upper
				for vehicle	for chemical			
B	1	Low	4	0.158	0.350	2.22	1.02	4.80
	1	Mid	4	0.158	0.120	0.76	0.45	1.28
	1	High	4	0.158	0.145	0.92	0.53	1.60
	3	Low	4	0.266	0.261	0.98	0.61	1.57
	3	Mid	4	0.266	0.227	0.85	0.57	1.28
	3	High	4	0.266	0.199	0.75	0.47	1.19
	4	Low	4	0.241	0.240	1.00	0.47	2.09
	4	Mid	4	0.241	0.292	1.21	0.54	2.71
	4	High	4	0.241	0.380	1.58	0.84	2.94
	5	Low	4	0.055	0.052	0.94	0.50	1.78
	5	Mid	4	0.055	0.038	0.69	0.39	1.21
	5	High	4	0.055	0.040	0.71	0.43	1.18
	6	Low	3	0.253	0.516	2.04	0.87	4.77
	6	Mid	3	0.253	0.283	1.12	0.66	1.91
	6	High	3	0.253	0.383	1.51	0.83	2.76
	7	Low	4	0.120	0.058	0.48	0.23	0.99
	7	Mid	4	0.120	0.115	0.95	0.65	1.40
	7	High	4	0.120	0.121	1.01	0.40	2.55

25JUL2008:16:32:31

Mean absorbance and SI value (SI_sub_C.txt)

Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance	Mean absorbance	95%CI SI	95%CI lower	95%CI upper
				for vehicle	for chemical			
C	2	Low	4	0.173	0.226	1.31	0.93	1.85
	2	Mid	4	0.173	0.422	2.45	1.71	3.50
	2	High	4	0.173	0.546	3.17	2.30	4.36
	6	Low	4	0.210	0.306	1.46	1.08	1.97
	6	Mid	4	0.210	0.573	2.73	1.56	4.77
	6	High	4	0.210	0.667	3.18	2.23	4.52
	7	Low	4	0.123	0.359	2.92	2.24	3.82
	7	Mid	4	0.123	0.514	4.18	2.82	6.20
	7	High	4	0.123	0.870	7.08	5.64	8.88

25JUL2008:16:32:31

Mean absorbance and SI value (SI_sub_D.txt)

Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	95%CI		
						SI	lower	upper
D	2	Low	4	0.178	0.196	1.10	0.78	1.55
	2	Mid	4	0.178	0.397	2.23	1.59	3.13
	2	High	4	0.178	0.600	3.37	2.42	4.68
	4	Low	4	0.271	0.426	1.57	1.01	2.44
	4	Mid	4	0.271	0.796	2.94	2.32	3.71
	4	High	4	0.271	0.947	3.49	2.67	4.57
	5	Low	4	0.150	0.171	1.14	0.65	2.01
	5	Mid	4	0.150	0.315	2.10	1.52	2.89
	5	High	4	0.150	0.617	4.11	3.02	5.58

25JUL2008:16:32:31

Mean absorbance and SI value (SI_sub_E.txt)

Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	95%CI		
						SI	lower	upper
E	1	Low	4	0.302	0.674	2.23	1.67	2.97
	1	Mid	4	0.302	1.110	3.67	2.93	4.61
	1	High	4	0.302	1.298	4.30	3.58	5.16
	2	Low	4	0.178	1.137	6.39	4.64	8.79
	2	Mid	4	0.178	1.162	6.52	4.65	9.16
	2	High	4	0.178	1.490	8.36	6.11	11.46
	3	Low	4	0.220	0.941	4.27	3.16	5.77
	3	Mid	4	0.220	1.378	6.25	4.92	7.95
	3	High	4	0.220	1.319	5.99	4.76	7.53
	4	Low	4	0.271	1.005	3.71	2.93	4.69
	4	Mid	4	0.271	1.434	5.29	4.24	6.60
	4	High	4	0.271	1.490	5.50	4.40	6.86
	5	Low	4	0.150	2.243	14.94	11.24	19.86
	5	Mid	4	0.150	2.819	18.78	14.41	24.48
	5	High	4	0.150	2.540	16.93	12.80	22.39
	6	Low	4	0.210	0.711	3.38	2.56	4.47
	6	Mid	4	0.210	0.944	4.50	3.34	6.05
	6	High	4	0.210	1.014	4.83	3.63	6.42
7	Low	4	0.123	0.705	5.73	4.14	7.95	
7	Mid	4	0.123	1.509	12.28	8.87	17.00	
7	High	4	0.123	1.593	12.96	10.28	16.35	

25JUL2008:16:32:31

Mean absorbance and SI value (SI_sub_F.txt)

Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	95%CI		
						SI	lower	upper
F	1	Low	4	0.107	0.188	1.76	1.10	2.82
	1	Mid	4	0.107	0.257	2.40	1.55	3.71
	1	High	4	0.107	0.400	3.73	2.33	5.98
	5	Low	4	0.053	0.395	7.44	2.44	22.66
	5	Mid	4	0.053	0.689	12.98	4.99	33.72
	5	High	4	0.053	1.525	28.73	12.82	64.36
	6	Low	4	0.163	0.162	0.99	0.71	1.39
	6	Mid	4	0.163	0.308	1.89	1.30	2.75
	6	High	4	0.163	0.367	2.25	1.62	3.13

25JUL2008:16:32:31

Mean absorbance and SI value (SI_sub_G.txt)

Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	SI	95%CI	
							lower	upper
G	1	Low	4	0.302	0.431	1.43	1.16	1.75
	1	Mid	4	0.302	0.417	1.38	0.96	1.98
	1	High	4	0.302	0.391	1.26	1.03	1.54
	2	Low	4	0.173	0.192	1.11	0.80	1.55
	2	Mid	4	0.173	0.201	1.16	0.83	1.62
	2	High	4	0.173	0.248	1.44	1.02	2.04
	3	Low	4	0.220	0.242	1.10	0.73	1.67
	3	Mid	4	0.220	0.267	1.21	0.75	1.96
	3	High	4	0.220	0.309	1.40	0.89	2.21

25JUL2008:16:32:31

Mean absorbance and SI value (SI_sub_H.txt)

Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	SI	95%CI	
							lower	upper
H	1	Low	4	0.158	0.248	1.57	0.97	2.55
	1	Mid	4	0.158	0.412	2.61	1.62	4.22
	1	High	4	0.158	0.537	3.41	2.10	5.52
	3	Low	4	0.266	0.320	1.20	0.74	1.96
	3	Mid	4	0.266	0.548	2.06	1.31	3.23
	3	High	4	0.266	0.764	2.87	1.91	4.32
	4	Low	4	0.241	0.491	2.04	1.23	3.36
	4	Mid	4	0.241	0.625	2.59	1.67	4.01
	4	High	4	0.241	0.804	3.34	2.08	5.36
	5	Low	4	0.055	0.291	5.25	2.45	11.26
	5	Mid	4	0.055	0.474	8.57	3.83	19.16
	5	High	4	0.055	0.746	13.48	7.27	24.97
	6	Low	4	0.253	0.450	1.78	1.01	3.13
	6	Mid	4	0.253	0.727	2.87	1.76	4.69
	6	High	3	0.253	0.827	3.27	1.54	6.94
	7	Low	4	0.120	0.192	1.59	1.13	2.25
	7	Mid	4	0.120	0.366	3.04	2.10	4.41
	7	High	4	0.120	0.462	3.84	2.06	7.16

25JUL2008:16:32:31

Mean absorbance and SI value (SI_sub_I.txt)

Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	SI	95%CI	
							lower	upper
I	3	Low	4	0.221	0.241	1.09	0.71	1.67
	3	Mid	4	0.221	0.365	1.66	1.09	2.52
	3	High	4	0.221	0.397	1.80	1.08	3.00
	4	Low	4	0.210	0.359	1.71	1.00	2.93
	4	Mid	4	0.210	0.397	1.89	1.18	3.02
	4	High	4	0.210	0.343	1.63	1.00	2.67
	7	Low	4	0.145	0.175	1.21	0.86	1.69
	7	Mid	4	0.145	0.313	2.16	1.46	3.20
	7	High	4	0.145	0.367	2.53	1.57	4.09