

資料5「LLNA-BrdU 法SOP」に従い陽性対照物質のみを用いた予備実験の実施を決定した。LLNA-BrdUバリ 実行委は、本研究計画書および、LLNA-BrdU 法実験SOPの改訂についての意見を実行委員長に提出した。本実行委は予備試験結果とこれらの意見に基づいて、8月22日の第2回実行委員会で、本研究計画書とLLNA-BrdU 法実験SOPを改訂した。得られた結果から、すべての施設で陽性対照物質は陽性と判断され、提案施設の背景データのばらつきと比べて極端に大きな施設感差が生じていなかったため、本実験を実施することに決めた。特に大きな問題が生じていなかったため、SOP の大きな変更はしなかった。

2.4 被験物質

本研究は遮蔽下で行うこととされていたが、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することにした。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「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、皮膚感作性の程度のバランスを考慮して最終的に12 被験物質を選択した。これらの物質は先立って行われたLLNA-DAバリデーションと同一の物質とした。選択された被験物質は、LLNA の結果を参考に3 濃度が設定された。これらの被験物質は各濃度に調製された後に遮蔽化され、対応する溶媒とともに各実験施設に送付された。送付された被験物質およびコード記号一覧を表2として示す。

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。

被験物質割付担当者は、表1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調製し、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2に示す。

表1. 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			○	○
・・・				・・・

表2. LLNA-BrdU法バリデーション研究物質リスト

コード	No.	Chemical name	溶媒	分類	Classification ※	適用濃度 (%)		
D	1	Isopropanol (2-Propanol)	A00	共通	Negative	10	25	50
I	2	Hexylcinnamic aldehyde (Hexylcinnamal, α -Hexylcinnamaldehyde)	A00	共通	Moderate	10	25	50
K	3	2,4-Dinitrochlorobenzene (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene)	A00	共通	Extreme	0.1	0.3	1
E	4	Nickel sulfate (Nickel(II) sulfate hexahydrate)	DMSO		False Negative	1	3	10
F	5	Dimethyl isophthalate	A00		Negative	10	25	50
A	6	Methyl salicylate	A00		Negative	10	25	50
H	7	Abietic acid	A00		Weak	10	25	50
J	8	3-Aminophenol	A00		Moderate	1	3	10
C	9	Isoeugenol (mixture of cis and trans)	A00		Moderate	1	3	10
L	10	Glutaraldehyde solution (ab. 25%)	ACE		Extreme	0.1	0.3	1
B	11	Formaldehyde solution (36~38%)	ACE		Strong	1	3	10
G	12	Cobalt chloride	DMSO		Strong	0.3	1	3

2.5 実験実施のスケジュール

平成18年8月~12月にかけて各施設が実験スケジュールを立て、実験を行った(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、ATP測定量)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を作成し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。

2.6.5 データ解析の方法

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2つの繰り返しによる測定値が得られるが、2つの値の平均値を解析に用いた。

2) SI値とその95%信頼区間の算出

主なデータ解析は、被験物質または陽性対照の吸光度および溶媒の吸光度の比で算出される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。

3) 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、対数変換を施したSI値の分散に基づいた指標で評価することにした。個々の実験で得られるSI値は実験内差を含んでいる。そこで、施設間再現性の指標を算出する際に、対数変換後のSI値の実験内のばらつきを考慮した施設間分散を算出し、指数をとることで指標を算出した。本報告書ではこの指標を $\exp(t2)$ と表記することにした。 $\exp(t2)$ の計算は、対数変換を施したSI値について施設間差を変量効果としたメタ・アナリシスの手法に基づいている(Normand(1999))。 $\exp(t2)$ の最小値は1であり、この値が1に近いことは施設間のばらつきがほとんどないことを示す。施設間差が大きくなるとこの値は大きくなる。この方法の詳細については資料10「SI値を用いた施設間再現性、施設内再現性の指標の算出法」に示した。施設間差の評価は同一物質の同一濃度について行った。施設内再現性については、ある施設の繰り返し測定されたSI値が必要となる。この研究では陽性対照物質を用いて行った。施設内再現性の評価の指標も $\exp(t2)$ を用いた。

4) 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(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行っている。同一物質、同一濃度についてただ一つの代表値を得るために、対数変換を施したSI値の重み付平均を求めた後、指数をとることを

行った。重み付き平均は、変量効果を用いたメタ・アナリシスにより算出した（別添8）。いずれかの濃度で重み付き平均が2を超えた場合に陽性、そうでない場合に陰性と判定し上記の代替可能性の指標を求めた。

5) EC3の算出方法

上記の方法で得た各濃度のSI値の重み付き平均が2となる濃度の予測値をEC2として算出した。算出方法はGerberickら（2004）に準じ、(1)すべての濃度でSI値が下回る場合は算出せず、(2)いずれかの2用量間でSI値の重み付き平均が2を挟む場合には直線補間により算出、(3)すべての用量でSI値の重み付き平均が2を上回る場合には、2に近い2つの濃度のSI値の重み付き平均を用いて、底が2の対数変換した値について直線補間して算出した。また、算出したEC2に基づき、感作性のカテゴリーを決め（Gerberickら（2004））、このカテゴリーでLLNA法とLLNA-BrdU法を比べた。

2.6.6 ソフトウエア

以上の解析は、SAS version 9を用いて行った。

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け結果を示す。基本的には1施設あたり6被験物質を実施したが、No.9は施設のスケジュールの関係で4被験物質のみを実施した。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ため、施設1は8被験物質分の実験を実施した。

表3. 被験物質の割付と実験順序の一覧

施設 割付番号	第1期		第2期			第3期		
	4群～6群	7群～9群	4群～6群	7群～9群	(10群～12群)	4群～6群	7群～9群	(10群～12群)
-	11 (B)	10 (L)	8 (J)	2 (I)	6 (A)	9 (C)	3 (K)	1 (D)
1	8 (J)	5 (F)	1 (D)	2 (I)	-	3 (K)	6 (A)	-
2	2 (I)	1 (D)	3 (K)	9 (C)	-	10 (L)	11 (B)	-
3	7 (H)	5 (F)	3 (K)	6 (A)	-	2 (I)	1 (D)	-
4	10 (L)	11 (B)	3 (K)	7 (H)	-	2 (I)	1 (D)	-
5	1 (D)	2 (I)	4 (E)	12 (G)	-	9 (C)	3 (K)	-
6	3 (K)	7 (H)	1 (D)	2 (I)	-	4 (E)	12 (G)	-
7	4 (E)	12 (G)	3 (K)	8 (J)	-	2 (I)	1 (D)	-
8	1 (D)	2 (I)	3 (K)	5 (F)	-	-	-	-
9								

3.2 研究の質について

研究の質を確保するために、以下のことを実施した。

- ・ 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の値との整合性の確認を行った。値が異なった場合、各施設への問い合わせを行ない、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

1) 析出、沈殿等について

複数の被験物質に析出や沈殿がみられた。しかし、同じ被験物質でも施設により析出・沈殿の有無が異なることが判明した。表4に被験物質の状態観察記録の報告のあった物質のみをまとめた。

表4. LLNA-BrdU パリテーション 被験物質溶液の取り扱い

記号	物質名	施設	被験物質配布者の調製時の状態	問題点	対処事項
B	Formaldehyde	5	溶解	-	
		6		乾きにくい	
		4		高濃度で析出あり	
E	Nickel Sulfate	3	70℃加熱および超音波懸濁	懸濁	超音波処理
		1		懸濁	ボルテック攪拌または超音波処理後、温水で溶解
		2		?	
F	Dimethyl salicylate	8	溶解	懸濁液がチップに詰まる	
		9		高濃度固化	温水で溶解
		7			
H	Abietic acid	7	高濃度では超音波にて懸濁	高濃度懸濁	
		4			
		1		懸濁	ボルテック攪拌
J	3-Aminophenol	5	溶解		
		8			
		2		析出あり	

その他被験物質で調製法に配慮したもの：G 超音波溶解

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5、表6に示す。施設によっては1日目に比べ6日目の体重が減っている施設もあったら、全体として施設間の大きな変動はみられなかった。

表5. 1日目の体重の基本統計量

施設	データ数	平均値	標準偏差	最小値	25%点	中央値	75%点	最大値
1	132	22.3	1.14	19.7	21.50	22.10	23.00	25.1
2	108	22.6	1.53	19.1	21.50	22.40	23.80	26.1
3	108	22.5	1.26	19.7	21.50	22.40	23.45	25.3
4	108	22.5	1.36	20.3	21.45	22.30	23.35	27.1
5	105	22.0	1.37	18.9	20.80	22.10	22.90	25.6
6	108	22.4	1.30	19.3	21.50	22.55	23.30	25.7
7	108	22.6	1.41	19.5	21.55	22.50	23.50	26.1
8	108	23.3	1.56	20.0	22.00	23.25	24.25	28.3
9	72	22.7	1.26	19.2	21.75	22.75	23.55	25.6

表6. 6日目の体重の基本統計量

施設	データ数	平均値	標準偏差	最小値	25%点	中央値	75%点	最大値
1	132	23.1	1.26	20.8	22.20	22.90	23.90	26.5
2	108	22.4	1.50	18.5	21.40	22.05	23.30	26.1
3	108	22.8	1.42	19.9	21.85	22.80	23.60	26.7
4	108	23.3	1.48	20.4	22.30	23.10	24.05	27.9
5	105	21.9	1.43	19.1	20.80	21.90	22.80	25.4
6	108	22.7	1.29	18.9	21.85	22.85	23.60	25.4
7	108	22.8	1.53	19.7	21.70	22.60	23.90	26.6
8	108	23.3	1.55	20.6	22.10	23.25	24.45	27.5
9	72	23.3	1.36	20.3	22.45	23.10	24.20	26.8

3.4.2 BrdU取り込み量（吸光度）

表7に各物質の溶媒および用量毎の吸光度の平均と標準偏差を示す。溶媒の吸光度が施設毎で大きく異なった。図3に示すように、陽性対照の吸光度も大きな差を示した。施設間で比較した結果、その値は10倍程度異なった。この理由として、施設毎の希釈方法の違いが挙げられる。これについては考察に詳細を記す。

表7. 施設・希釈濃度ごとの吸光度群内平均, SI 値とその95%信頼区間

施設・希釈濃度ごとの吸光度群内平均, SI 値とその95%信頼区間 SI_list.txt 104
2007年06月23日 土曜日 午後06時07分33秒

施設	希釈濃度	溶媒 吸光度 群内平均	適合基準 0.1-0.2	陽性対照 吸光度 群内平均	SI 値	95%CI 下限	95%CI 上限
1	1	0.139	*	0.778	5.60	4.15	7.57
	2	0.104	*	0.586	5.64	4.32	7.36
	3	0.090		0.369	4.09	3.40	4.93
	4	0.084		0.313	3.73	3.24	4.30
	5	0.077		0.233	3.02	2.55	3.57
2	1	0.034		0.164	4.82	2.03	11.41
	2	0.003		0.081	26.11	9.45	72.11
	3	0.000		0.058	.	.	.
	4	0.000		0.046	.	.	.
	5	0.000		0.028	.	.	.
3	1	0.113	*	0.551	4.87	3.13	7.59
	2	0.037		0.330	8.88	5.26	14.97
	3	0.021		0.244	11.68	5.45	25.00
	4	0.011		0.174	15.27	6.49	35.93
	5	0.013		0.190	15.08	7.42	30.66
4	1	0.031		0.296	9.64	4.37	21.27
	2	0.001		0.093	.	.	.
	3	0.002		0.047	30.22	9.17	99.54
	4	0.004		0.013	3.44	1.57	7.51
	5	0.002		0.003	1.70	0.15	19.72
5	1	0.398		1.151	2.89	0.78	10.70
	2	0.200	*	0.783	3.92	1.18	12.98
	3	0.113	*	0.655	5.77	1.07	31.24
	4	0.064		0.497	7.78	1.26	48.01
	5	0.050		0.250	4.95	0.81	30.34
6	1	0.106	*	0.618	5.83	3.83	8.87
	2	0.089		0.295	3.31	1.92	5.70
	3	0.088		0.210	2.40	1.83	3.15
	4	0.080		0.150	1.87	1.53	2.29
	5	0.082		0.140	1.71	1.35	2.15
7	1	0.138	*	0.939	6.81	5.18	8.97
	2	0.060		0.603	10.12	7.39	13.86
	3	0.036		0.441	12.38	8.11	18.90
	4	0.024		0.375	15.47	7.90	30.32
	5	0.020		0.268	13.61	7.16	25.85
8	1	0.167	*	0.607	3.63	2.51	5.24
	2	0.102	*	0.306	3.00	1.98	4.55
	3	0.089		0.277	3.11	1.72	5.65
	4	0.077		0.171	2.23	1.78	2.78
	5	0.084		0.185	2.21	1.53	3.20
9	1	0.064		0.691	10.85	6.27	18.80
	2	0.017		0.307	17.63	7.91	39.29
	3	0.013		0.215	16.39	7.57	35.46
	4	0.009		0.157	16.91	7.44	38.40
	5	0.005		0.107	23.29	7.29	74.36

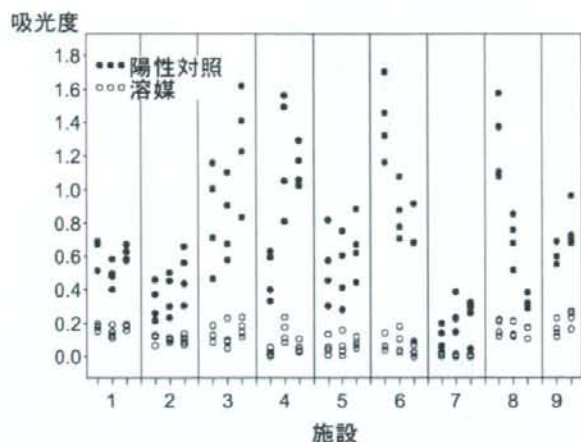
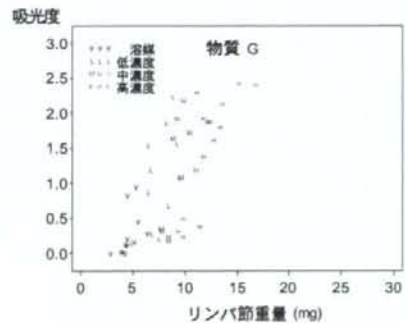
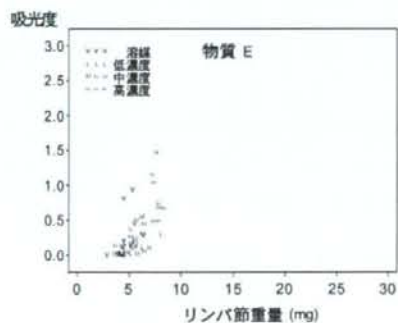
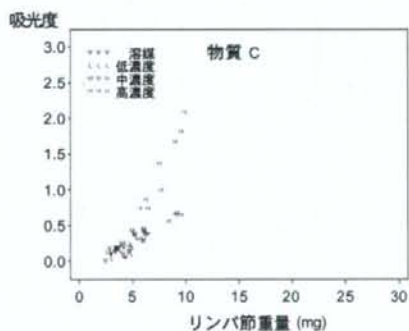
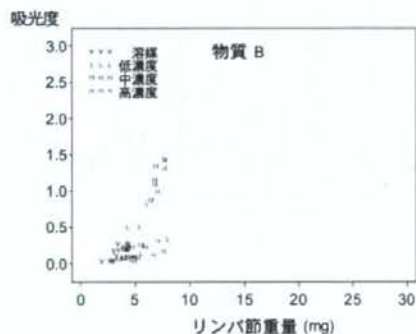


図3. 各施設におけるBrdU取り込み量（吸光度の分布）

3.4.3 リンパ節重量とBrdU取り込み量の関係

リンパ節重量と吸光度の関係を評価できる物質の結果のみを図4に示す。リンパ節重量と吸光度の間に直線的な関係があるものもあったが、直線関係にないと考えられる物質も認められた。被験物質の影響が強いほどリンパ節重量は増加するので吸光度とリンパ節重量の間に直線的な関係がない場合には、各施設で適切な操作が実施されなかったことを示している。



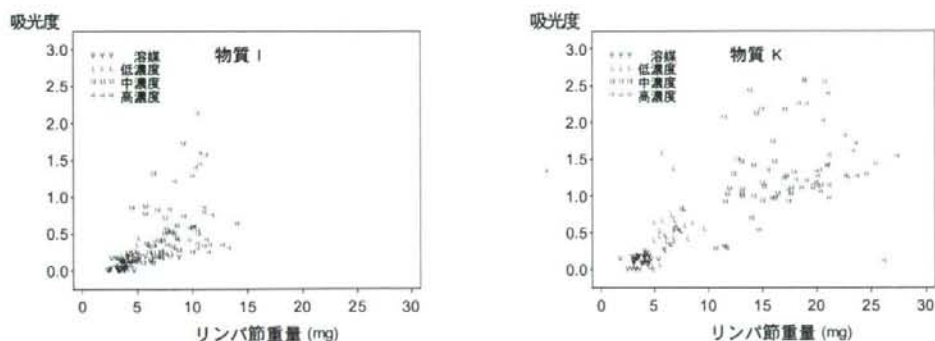


図4. 吸光度とリンパ節重量の関係

3.5 LLNA-BrdU の分析感度

本報告書では、分析感度を陽性対照物質が適切に陽性と判定される能力と定義した。図5、図6 にそれぞれ予備実験、本実験における各実験の陽性対照物質のSI 値とその95%信頼区間を示す。

予備試験および本試験ともいずれも陽性と判定する基準値であるSI 値2を超えていた。しかし、SI 値の範囲は予備試験の平均値が2~6であるのに対し、本試験では2~30に上がっていた。この結果からも予備試験と本試験間で施設内および施設間差が極めて大きいと考えられた。

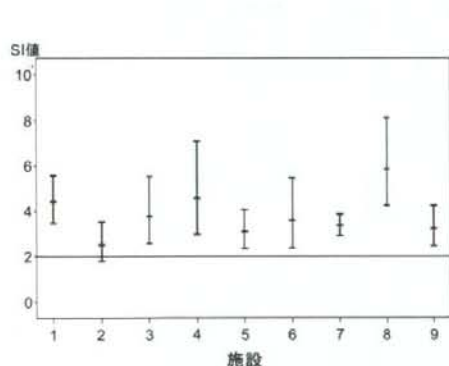


図5. 予備試験のSI値

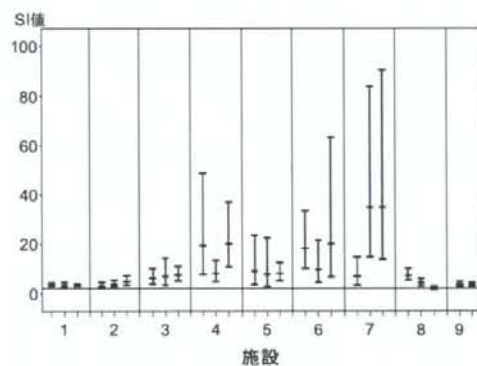
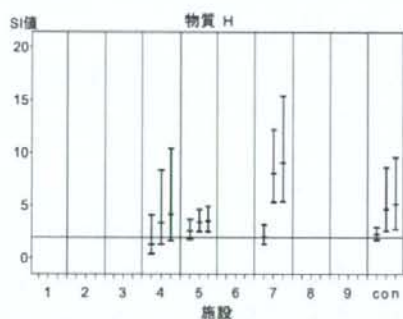
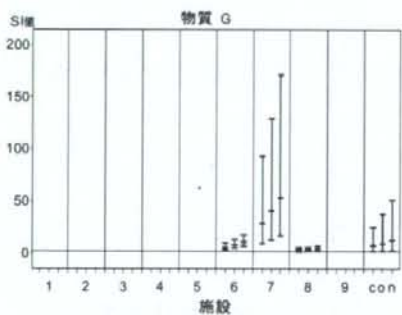
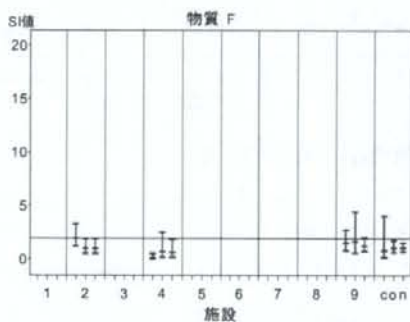
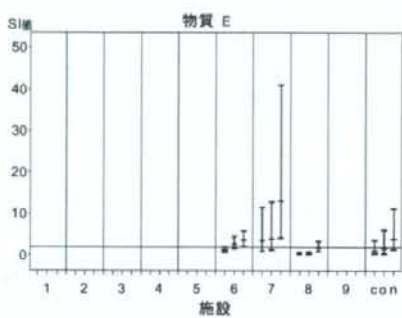
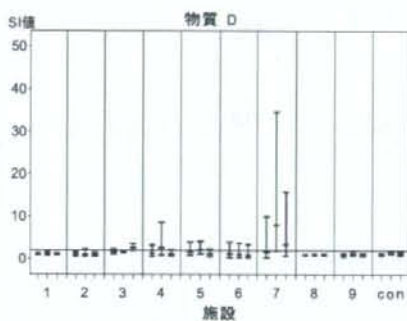
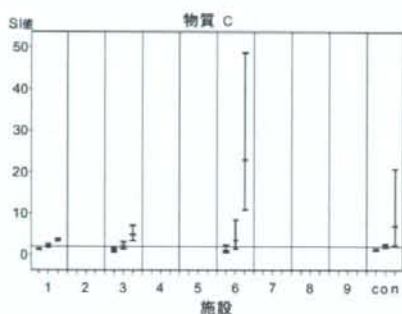
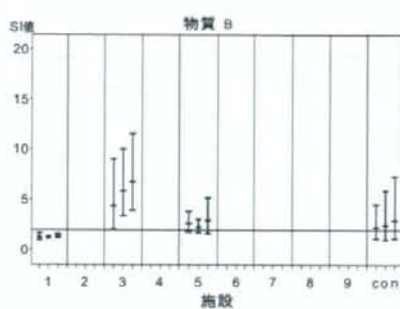
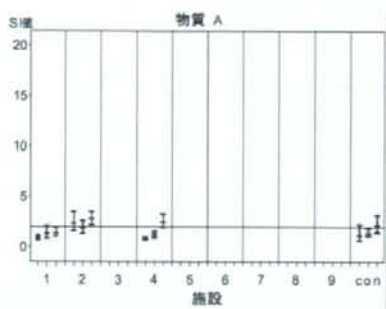


図6. 本試験のSI値

3.6 各被験物質の用量反応関係

図7 にSI 値の用量反応関係を示す。図中con と示されているのは、メタ・アナリシスによるSI 値の重み付き平均を示している。

ほとんどの物質において、各施設のSI 値の信頼区間が大きく、正當に評価されていないと判断した。



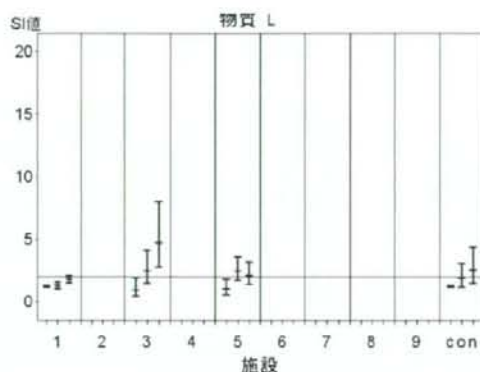
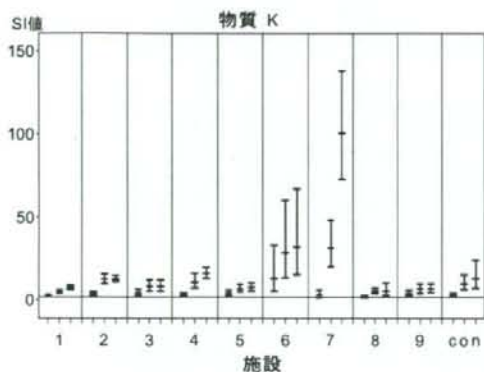
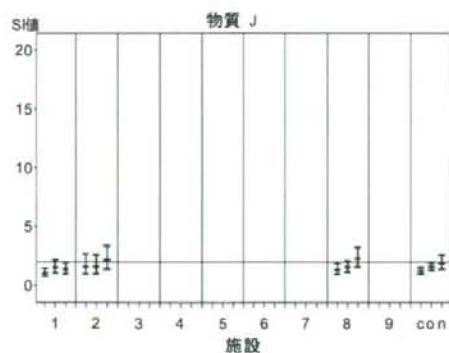
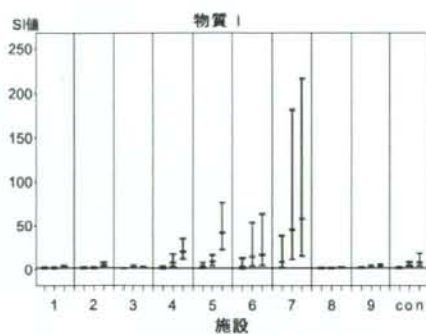


図7. 物質毎に各施設のSI値

3.7 施設内再現性

図5、図6の結果からほとんどの物質において、各施設のSI値の信頼区間が大きく、施設間再現性が良好ではないことが明らかになった。

3.8 施設間再現性

図5～7の結果からほとんどの物質において、各施設のSI値の信頼区間が大きく、施設間再現性が良好ではないことが明らかになった。

3.9 代替可能性

この検討を行う以前の問題が解決されていないことから、比較は実施しなかった。

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)の文献の値を用いる予定であったが、比較しなかった。対象となる試験法との対応性として、GPMT/BT法を基準としたが、やはり比較は実施しなかった。

4. 考察

4.1 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 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-BrdU 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と考えた。

4.2 本研究の妥当性

4.2.1 本研究で評価したLLNA-BrdU 法の特徴

本研究で評価した試験法であるLLNA-BrdU法は、感受性の評価に関する原理はLLNA 法と同じである。LLNA-BrdU 法の特徴は、エンドポイントをBrdUの取り込み量としてキットを用いて吸光度の測定ととしていることである。吸光度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。また、再測定が可能である。

4.2.2 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4)の中から12 被験物質を選択した。LLNA 法による文献のEC₂ 値に基づき感受性を3 段階(無(negative)、弱(weak, moderate)、強(strong, extreme))に分類した場合、12 被験物質の感受性の内訳は、無が4 物質、弱が4 物質、強が4 物質であり、試験物質の選択は妥当と考えた。ブラインドされた被験物質を配布者が事前に調製して送付した理由として、①予備試験なしで使用動物数を抑え、②各被験物質の同一濃度での結果を比較すること、③適用濃度から感受性の強度を予測できないようにする、④溶媒の選択、溶解または懸濁方法の統一化、⑤複数被験物質における用事調製操作の簡便化、ミスの削減が大きな目的であった。そのため、①選択物質も安定性が高いものになった、②実験開始の1週間前に調整し、DMSOを溶媒とする被験物質を除いて冷蔵で送付し、使用までの冷蔵保管を徹底した、③実験時の状態確認および溶解、均一懸濁液の調整を徹底した。結果として、被験物質の安定性を疑問視する声もLLNA-BrdUバリ実行委の中からも上がったが、長短所を比較して事前調整が選択された。また、LLNA-DAバリデーションにおいて溶媒でプラスチック容器が溶けたとの反省をもとに、すべての被験物質溶液はガラス瓶に入れたものが配布された。

表4に示すように、被験物質によっては析出、懸濁などの記録が残されたが、施設間でかけ離れた対処を行っていないことを事後の聞き取り調査などで確認した。

4.2.3 試験法の普及

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を統一した。被験物質名は遮蔽されていたにもかかわらず、9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の施設間再現性は良好でなかったため、これらの配慮は結果に反映されなかった。

4.2.4 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(資料7)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。これらの記録は試料等手配担当者およびデータ解析担当者ですべて確認作業が行われ、不備については聞き取り調査を実施し、すべての内容を確認した。

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（資料8）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。

4.2.5 個々の被験物質に対する考察

バラツキのない方法の改善が必要なことから、個々の物質について考察しない。

4.3 本研究の限界と今後の課題

本方法は、希釈によって再測定が可能である利点を持つが、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しまった。この研究の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液を希釈して測定を行うことと決めていたが、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（資料11参照）。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ることになる。これが施設間差の大きかった一因であると考えられた。

実験操作によるばらつきが大きかった点に対して、LLNA-BrdUバリ実行委にて議論し、特に以下の点について対応策、改善点が決まった。

- 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、変更することが出来るが、陰性対照ウエルの吸光度が0.1-0.2となる条件を採用する。この範囲にあることを実験の成立条件とする。
- ② AOO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、再測定を行う。0.1を下回った場合には解析対象から外す。なお、予め数段階の希釈懸濁液（5～15ml 懸濁液を調整し、生理食塩液で希釈した浮遊液）を調製し、同時に測定を行っても構わないが、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 ブランクは差し引く
- ④ その他、実験者から上がってきた試験操作法の問題点もSOPに追記する（BrdU腹腔内投与、懸濁液の調整、洗浄・乾燥操作など）

さらに本研究にはいくつかの限界がある。それらについても記載する。

・被験物質について

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。

・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。用事調整でないことから、物質の安定性についてはデータがない限り反論できない。

・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験経験のある施設を選んだ。

LLNA-DA法バリデーションから続く試験法への慣れが、推測での選択につながった可能性もある。

5. 結論

本研究で実施した12の被験物質の濃度範囲で得られた結果は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した。検討結果としては、吸光度で測定する溶媒のBrdU取り込み量の大きさにSI値が大きく依存すること、ブランクに関する処置が不明確であったこと、希釈の影響が十分にわかっていなかったことが考えられ、これらを反映させるべきである。

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致します。

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）、正門孝臣（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, DA., 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, DA. 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, DA., 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, DA., 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, DA., 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, DA., 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, DA., 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, DA., 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, DA., 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 49 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 DA. (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, DA. (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, DA., 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, DA., 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, DA., 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, DA., 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. 50

- 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.
- Saillstad, 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.
- Takeyoshi, M., Yamasaki, K., Yakabe, Y., Takatsuki, M. and Kimber, I. (2001). Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicology Letters* 119, 203-208

資料1 LLNA-BrdU法バリデーション研究 実行委員名簿

番号	氏名	所属(略記)	勤務先	会員	任命理由	役割
1	大森 崇	京都在	京都大学大学院医学研究科医療統計学分野	○	バリ委員	データ管理
2	小島肇	国立衛研	国立医薬品食品衛生研究所薬理部	○	技術	委員長
3	寒水孝司	大阪大	大阪大学臨床工学融合研究教育センター	○	バリ委員	割付とデータ管理・解析
4	吉村 功	理科大	東京理科大学工学部経営工学科	○	バリ委員	無任所
5	出原賢治	ダイセル化学	ダイセル化学工業株式会社 評価・解析センター	○	施設代表	動物手配, 実験
6	五十嵐良明	国立衛研	国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部	○	施設代表	実験
7	金澤由基子	食薬センター	財団法人食品薬品安全センター-薬野研究所 医療用具試験室	○	施設代表	実験
8	武吉正博	化評研	財団法人 化学物質評価研究機構日田事業所 試験第四課	○	施設代表	技術指導
9	青儀 巧	大塚製薬	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	○	施設代表	実験
10	有馬和範	大正製薬	大正製薬株式会社, 安全性研究室	○	施設代表	実験
11	湯浅敦子	富士フイルム	富士写真フイルム株式会社CSR推進部環境・品質マネジメント部 素材試験センター	○	施設代表	実験
12	牧栄二	安評センター	財団法人食品農薬医薬品安全性評価センター	○	施設代表	実験

資料1 LLNA-BrdU法バリデーション研究 実験担当者名簿

番号	氏名	担当	所属(略記)	勤務先
1	上森健至	実験	ダイセル化学	ダイセル化学工業株式会社 評価・解析センター
2	五十嵐良明 山田真生	実験	国立衛研	国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部
3	森村智美 古谷真美 志田勝彦	実験	食薬センター	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
4	後藤浩彦 中桐直人 青儀巧	実験	大塚製薬	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
5	有馬和範 山崎紀世 織原由佳理	実験	大正製薬	大正製薬株式会社, 安全性研究室
6	小宮千春 吉野幸江 秋元真一	実験	富士フィルム	富士写真フィルム株式会社CSR推進部環境・品質マネジメント部 素材試験センター
7	藤島敦 竹原広	実験	安評センター	財団法人食品農医薬品安全性評価センター

皮膚感作性試験代替法（LLNA-BrdU 法）第2次バリデーション研究計画書（第2次バリ研究計画書）（Version 1.0）

2007年8月9日 作成者 小島 肇

0. まえおき

本研究は、日本動物実験代替法学会（本学会）バリデーション委員会が実行委員会を組織して行うものである。

研究遂行中に本計画書の内容を変更したときは、その度ごとに改訂日、改訂内容、改訂責任者を本計画書に追記する。

1. 研究目的

本研究の目的は、皮膚感作性試験代替法の LLNA-BrdU 法 で得られる皮膚感作性の判定が、被験物質遮蔽下で複数の施設間でどの程度一致するか（施設間再現性）、LLNA-BrdU 第1次バリデーション実験の改善が妥当に行われたか、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）という3つの課題を、多施設での実験を通して評価することである。

2. 実行組織

本組織の正式名称を「LLNA-BrdU 法バリデーション研究第2次実行委員会」とし、連絡等での略称は「LLNA-BrdU バリ第2次実行委」とし、本計画書内では単に「第2次実行委」とする。

第2次実行委は次の委員で構成する。

- 1) 実験参加施設代表：実験参加施設から各1名
- 2) バリデーション委員会委員：若干名
- 3) 技術担当として必要な委員：若干名

実際の委員は、それぞれの組織からの推薦に基づいて本学会バリデーション委員会が任命し、資料1「LLNA-BrdU バリ第2次実行委リスト」にリストアップしておく。決定の理由及び時点は記録に残す。

研究遂行においては、小島 肇が主任研究者を務める厚生労働科学研究「動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究」班の協力を得る。

第2次実行委では以下の役割の担当者を第2次実行委の内あるいは外から委嘱し、その氏名を資料2「LLNA-BrdU バリ研究第2次担当者リスト」に残す。

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：技術研修の準備を行い、LLNA-BrdU 法の内容、SOP、記録用紙等の説明を行い、実技指導を行う。

被験物質選定担当者：資料3「被験物質候補リスト」より、研究に用いる物質を選定する。ただし、用いる物質はLLNA-DA法の被験物質と同様にする。

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・測定機器手配担当者：実験用動物の注文・配布、測定機器の貸借の手配を行う。

試料等手配担当者：割付デザインとSOPに従って試料を調製し、コード化して実験参加施設に、関連する資材と共に送付する。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：第2次実行委に所属し、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、データ解析を行う。中間報告会では、解析結果をまとめて報告する。

3. LLNA-BrdU 法の実験手順

実験担当者は、本書：資料4「LLNA-BrdU 法第2次研究計画書」にもとづいて第2次実行委が作成した資料5「LLNA-BrdU 法第2次実験SOP (Version 0.1)」に従って、第2次実行委が用意あるいは指定した試料・資材を用いて、LLNA-BrdU 法による被験物質の評価実験を行う。

4. 研究日程

本学会バリデーション委員会は2006年8月23日に、実験参加施設を確定し、委員と研究計画書を決定し、東京にて委員会を発足させ、以後の研究遂行を第2次実行委に委任する。実験担当者は2006年11月末日までに各施設で実験を行う。

被験物質割付担当者は2006年9月中旬までに被験物質の割付を行い、結果を試料等手配担当者に報告する。試料等手配担当者は被験物質割付の結果に従い被験物質をコード化した後、実験参加施設の実験実施日程に合わせて資材とともに被験物質を実験参加施設に送付する。

実験担当者は2007年10月初旬より実験を開始し、2006年12月末までに実験結果をデータ解析担当者に報告する。第2次実行委は2008年1～2月に2次実験の中間報告会を開催する。第2次実行委は2008年3月末までに報告書をまとめ、第2次バリデーション実験遂行についての検討を行う。この検討ではSOPを見直し、必要に応じてその改定を行う。

第2次実行委は2008年4月にLLNA-BrdU 法のバリデーション研究の報告書を本学会バリデーション委員会に提出する。

5. 実験参加施設

実験参加施設は次の条件を満たすものとする。

- (1) 第2次実行委に本学会会員を施設代表（参加施設代表者）として参加させる。
- (2) 実験において施設に求められる機材等（動物飼育施設等）を用意できる。
- (3) LLNA-BrdU 法の第1次バリデーション実験に参加した施設
- (4) 6被験物質を担当できる施設

実験参加施設は参加施設代表者もしくは実験担当者の中から実験について責任を負う実験責任者をおく。

6. 被験物質

被験物質選定担当者は資料3「被験物質候補のリスト」から、既知データに基づいて、皮膚感作性の程度のバランスを考慮して被験物質を選定し、選定結果を被験物質割付担当者に知らせる。被験物質としては、なるべく既知データが豊富で、LLNAの実験結果が存在するものを採用する。被験物質割付担当者は割付のデザインを作成し、試料等手配担当者に