

知らせる。試料等手配担当者は被験物質割付担当者のデザインに基づいて、実験担当者に被験物質が何であるかわからないようにコード化して、関連試料と共に実験参加施設に送付する。

7. 被験物質の実験参加施設への割付

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により選択された被験候補物質の内の2物質を標準被験物質とし全参加施設に、その他の被験物質については、バランスを考慮して一部の施設に割り付ける。被験物質コードと実験参加施設への割付、被験物質溶液の調製・配布は、試料・機器手配担当者が行ってその記録を管理する。

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	○ ○ ○ ○		
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	○ ○		
・・・	・・・		

8. 実験動物、機器、被験物質試料の準備

試料等手配担当者は、皮膚感作性の強度に応じて各被験物質の試料溶液を調製し、実験参加施設に配布する。

動物・機器手配担当者は、各実験施設と打ち合わせを行い、動物の手配を行う。

9. 経費

第2次実行委に参加するための旅費は自弁とする。

第2次実行委が送付するもの以外の実験器具・消耗品の費用は、各実験参加施設が負担する。ただし、実験用動物購入の費用は各施設が負担する。

10. 技術研修と予備実験

参加する施設は、すべて第1次バリデーション実験に参加していることから、技術研修と予備試験を実施しない。

データ解析担当者は、送付されたデータを速やかに検討し、検討結果を第2次実行委に報告する。実行委員長は、データ解析担当者からの報告を検討し、本実験に進むことについての結論を出し、実験参加施設に通知する。実行委員長は、計画変更の必要があると判断したときは直ちに、対面あるいはメールでの第2次実行委員会を招集し、計画変更を審議し、滞りない進行を図るものとする。

11. データ管理

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

実験担当者または実験参加施設代表者は、記録用紙の情報を所定の電子ファイルに転載し、電子ファイル、および記録用紙のコピーをデータ解析担当者に送付する。実行委員長は、各施設から送られてきたGLP 準拠の記録のコピー、データベース、データ解析結果等を、バリデーション研究の成果が社会的に承認されたと本学会バリデーション委員会が判断するまで、指定した場所（国立医薬品食品衛生研究所、安全性生物試験研究センター、薬理部、新規試験法評価室）に5年間保管する（研究終了後5年間）。

12. データ解析

データ解析担当者はデータ内容についての疑問を各実験者に問い合わせ、クリーニングを行った後に、基本データベースを作成する。データベースには、前節で求められている記録のうち、実験結果の理解に必要なことを全て含める。

データ解析担当者は研究の目的に沿ったデータ解析を行う。解析では、次の2つを主解析とする。

- (1) 標準被験物質と陽性対照物質のSI 値及び指定したSI 値を与える濃度の施設間ばらつきの評価
 - (2) 過去の生体での実験結果との比較における、感度・特異度・一致度の評価
- データ解析担当者は、データ解析の結果を中間報告会及び最終報告会で報告する。

13. 中間報告会

データベースが固定され、一通りのデータ解析ができた段階で、実行委員長は固定されたデータの確認と解析結果の検討を行うために、本第2次実行委の委員と実験担当者が参加する中間報告会を開催する。

14. 結果の公表

実行委員長は、中間報告会の討論結果をふまえた報告書を作成し、最終報告会を開催した後、最終報告書を本学会バリデーション委員会に提出する。

本第2次実行委は、研究結果を厚生労働科学研究班報告書、学会報告、学術論文として公表する。公表の際の著者名は本第2次実行委の委員とし、実験担当者名を報告書末尾に記載する。

15. 各種問い合わせ先

実験内容とSOP：武吉正博「takeyoshi-masahiro@ceri.jp」

被験物質、試料、共通消耗品：小島肇夫「h-kojima@nihs.go.jp」

データシートとその送付：寒水孝司「sozu@ac.jp」

計画書、報告書、その他一般事項：大森崇「omori@pbh.med.kyoto-u.ac.jp」

以上

LLNA-DA法バリデーション研究候補物質リスト

出原、五十嵐、武吉

No.	0206薬No.	Chemical name	CASRN	Wako (content/%)	溶媒	LLNA	EC3 (%)	Classification※	PMT/BAMT/HPT/非標準豚鼠皮試	LLNA-DA設定濃度 (%)			備考
										低用量	中用量	高用量	
1	1	2,4-Dinitrochlorobenzene (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene)	97-90-7	25g 1300	AOO (2)	+	(1) 0.04 (2)	Extreme	+	(1)	Ext O 4		
2	3	4-Phenylendiamine (p-)	100-50-3	25g 1500	AOO (2)	+	(1) 0.1 (2)	Extreme	+	(1) + (1) + (1) + (1)	St O 4		
3	4	Glutaraldehyde solution	111-30-8	25ml 700	ACE (2)	+	(1) 0.1 (2)	Extreme	+	(1) + (1) + (1) + (1)	St O 4		Glutaraldehydeの濃度として記載する。
4	5	Potassium dichromate	7778-50-9	25g 1100	DMSO (6)	+	(1) 0.14 (8)	Strong	+	(1) + (1) + (1)	St O 4		
5	6	Cobalt chloride	7648-79-9	25g 1900	DMSO (6)	+	(1) 0.5 (6)	Strong	+	(1) + (1) + (1)	St O 4		溶解性が悪く超音波処理必要。
6	7	Formaldehyde solution (39%)	50-00-0	500ml 680	ACE (2)	+	(1) 0.7 (2)	Strong	+	(1) + (1) + (1) + (1)	St O 3		Formaldehydeの濃度として記載する。
7	8	Isoeugenol (mixture of cis and trans)	97-54-1	25g 2500	AOO (2)	+	(1) 1.8 (2)	Moderate	+	(1)	Mc O 4		
8	11	Cinnamic aldehyde (trans-Cinnamaldehyde)	104-55-2	25ml 900(Kanto)	AOO (2)	+	(1) 3.1 (2)	Moderate	+	(1) + (1) + (1)	Mc O 4		
9	12	3-Aminoaniline	591-27-5	25g 1500	AOO (2)	+	(1) 3.2 (2)	Moderate	+	(1)	Mc O 3		
10	14	Hexylcinnamic aldehyde (<i>n</i> -Hexylcinnamaldehyde)	101-68-0	25ml 1700	AOO (2)	+	(1) 8.4 (2)	Moderate	+	(1)	Mc O 4		
11	15	Eugenol	97-53-0	25g 1050	AOO (2)	+	(1) 12.9 (2)	Weak	+	(1)	We O 4		
12	16	Citral	5392-40-5	25g 2000	AOO (3)	+	(1) 13 (3)	Weak	+	(1) + (1)	We O 4		
13	17	Abietic acid	514-10-3	5g 2700	AOO (2)	+	(1) 14.7 (2)	Weak	+	(1)	We O 3		
14	19	Cyclamen aldehyde (1-Isopropylphenyl-2-propanal)	103-95-7	5ml 1200	AOO (2)	+	(2) 22.3 (2)	Weak			We O 3		
15	25	Nickel sulfate (Nickel II, sulfate hexahydrate)	10101-98-1	25g 1050	DMSO (6)	-	(1) >2.5 (6)	False Negative	+	(1) + (1) + (1)	2		溶解性が悪く超音波処理必要、5%は懸濁。
16	27	Dimethyl isophthalate	1459-93-4	25g 1000	AOO (6)	-	(1) >25 (6)	Negative	-	(1)	O 4		
17	28	Methyl salicylate	119-36-8	25ml 1250	AOO (6)	-	(1) >25 (6)	Negative	-	(1)	NC O 3		
18	31	2-Hydroxypropyl methacrylate	973-26-2	25ml 1300	AOO (2)	-	(1) >50 (2)	Negative	-	(1)	NC O 3		
19	32	Isopropanol (2-Propanol)	67-63-0	500ml 1000	AOO (2)	-	(1) >50 (2)	Negative	-	(1)	NC O 4		
20	36	Lactic acid (DL-)	598-62-3	500ml 2400	DMSO (2)	-	(1) >25 (2)	Negative	-	(1)	NC O 1		Lactic acidの濃度として記載する。

GPMT: guinea pig maximization test

BA: Buehler assay

HMT: human maximization test

HPTA: human patch test allergen

nonstd: nonstandard guinea pig tests

ACE: Acetone

参考文献

- Hanaka, K. et al. (2001). Regulatory Toxicology and Pharmacology 34, 274-286.
- Gerberick, G. F. et al. (2004). Contact Dermatitis 50, 274-288.
- Basketter, D. A. et al. (2000). Contact Dermatitis 42, 344-346.
- Lowless, S. E. et al. (1996). Toxicology 108, 141-152.
- Kimber, I. et al. (1990). J. Toxicol. Environ. Health 33, 563-579.
- Basketter, D. A. et al. (1992). Fd. Chem. Toxicol. 30, 65-69.
- Basketter, D. A. et al. (1995). Fd. Chem. Toxicol. 36, 327-333.
- Basketter, D. A. et al. (1999). American Journal of Contact Dermatitis 10, 207-212.
- Ehling, G. et al. Toxicology 212, 69-79 (2005)
- Basketter, D. A. et al. Contact Dermatitis 53, 260-287 (2005)

※Classification

Classification of relative skin-sensitization potency using local lymph node assay EC3 values	EC3 value (%) Potency classification
>10 <100	Weak
>1 <10	Moderate
>0.1 <1	Strong
<0.1	Extreme

Gerberick, G. F. et al. (2004). Contact Dermatitis 50, 274-288.

LLNA-BrdU 法実験 SOP

(Version 1.01)

改訂 070826

以下に、LLNA-BrdU 法バリデーション研究における、2 被験物質を単位とした実験の標準作業手順を示す。

被験物質数や動物数が変わるときは、この手順での関連部分を変更して適用する。

§0 実験前の機器・器具の準備

表 1 に示す実験機器・器具、試薬を用意する。

§1 マウス入荷のための準備

LLNA-BrdU バリ実行委と事前に協議・決定した入荷予定日までに、37 匹の CBA/JNCrlj 雌マウスを入荷して馴化が開始できるように、自施設の規準に従った準備を行う。

馴化終了までに、4 匹同時飼育が可能なケージを 9 個準備し、それぞれのケージに以下の内容を表記しておく。

- 第 1 群：「AOO」
- 第 2 群：「陽性対照」
- 第 3 群：「溶媒」
- 第 4 群：「被験物質 Y 低濃度」
- 第 5 群：「被験物質 Y 中濃度」
- 第 6 群：「被験物質 Y 高濃度」
- 第 7 群：「被験物質 X 低濃度」
- 第 8 群：「被験物質 X 中濃度」
- 第 9 群：「被験物質 X 高濃度」

ここで被験物質の「X」あるいは「Y」という記号は配布された試料の記号のことである。データの記入ミスを防ぐために、群番号は原則としてこの順にする。実験は 3 回実施するので、実験番号「1」「2」「3」も表記しておく。

§2 入荷、馴化、群分け

37 匹のマウスが入荷されたら、施設の規準に従って直ちに馴化を開始する。馴化期間は 5 日以上 16 日以内とする。

馴化の後、耳介の損傷等の異常が認められない 36 匹を、乱数等を用いてランダムに 4 匹ずつの 9 群に分け、§1 で準備したケージに入れる。異常が認められないマウスが 36 匹に満たない場合

は、群番号の大きい順に 1 群 3 匹とする。群に含めないマウスは適切な安楽致死法を用いて殺処分する。

マウスは、油性インキによる尾へのマーキング等に夜ケージ内の個体識別及びケージカード等によるケージの識別によって、群番号と群内の各個体が識別出来るように配慮する。

マウスは、入荷から本実験終了までの期間中、室温 22℃ (±3℃)、湿度 30~70%、12 時間明暗サイクルの条件下で飼育を行い、餌および水は自由に摂取させる。この飼育条件に逸脱が生じた場合は、その内容を記録しておくこと。

§3 機器・器具、試薬、試験液の確認と保管

LLNA-BrdU バリ実行委から試料がとどいたら、送付されている内容表と内容物が一致していることを確認する。

試験液 (AOO、陽性対照、溶媒、被験物質 Y 低濃度、被験物質 Y 中濃度、被験物質 Y 高濃度、被験物質 X 低濃度、被験物質 X 中濃度、被験物質 X 高濃度) に、それぞれ対応する群番号 1~9 を記入し、試験管立て等に順に並べ、速やかに冷蔵保管、すなわち 0℃~10℃ (より望ましくは 2℃~8℃) に維持して保管する。BrdU 溶液は-20℃以下で凍結保存する。実験の際にはこれを取り出して使用する。BrdU は投与前に溶解して用いるが、析出が認められる場合は約 37℃のウォーターバス等で加温し完全に溶解した後投与する。

試験液内の AOO は Acetone/olive oil (4:1 v/v) であり、陽性対照は Hexylcinnamaldehyde (HCA, CAS No: 101-86-0) の 50% AOO 溶液である。

§4 試験液の調製

陽性対照物質及び AOO は調製物として事務局から送付される。試験物質は事務局によって各試験機関に割り付けられた物質が、予めバイアル瓶に秤量・分注されたものが送付される。各試験機関は事務局からの指示に従い、所定量の媒体をバイアル瓶に添加し、試験液を調製する。調製は投与当日に行うこととする。

§5 感作操作 (第 1,2,3 日目の操作)

- 5.1) 試験液を取り出し、指示書が添付されている場合は指示 (たとえば、投与前の加温あるいは超音波処理など) にしたがって、前処理を行う。
- 5.2) 第 1 日目の投与前にマウスの体重を測定して所定の用紙に記録する (最小単位: 0.1g)。
- 5.3) 気道を確保する状態で、親指と人差し指で頭部を保定し、リングピンセット等を用いて耳介を保定し、(図 1 参照) マイクロピペッターを用いて試験液を両耳介に塗布する。リングピンセットは試験物質毎に準備或いは媒体を用いて十分に洗浄した後に使用しても良いが、その場合は必ず低濃度群から高濃度群の順に投与を行うこととする。塗布量はそれぞれの耳介に 25µL と少量であるが、流れ落ちないように注意し、少量ずつ数回に分けて塗布を行う。



図1 マウスの保定と耳介の保持

- 5.4) 第1群の試験液塗布の開始時刻および第9群の試験液塗布の終了時刻を記録し、終了後に残った試料を速やかに冷蔵保管する。
- 5.4) この塗布を、1日1回、連続3日間、ほぼ同じ時刻に行う。
- 5.5) 操作中には、動物を注意深く観察し、異常所見が認められた場合は、その所見を所定用紙に記録する。

§6 BrdU 溶液の調製

BrdU 溶液は投与日前に Bromodeoxyuridine を 10mg/mL となるように生理食塩液に溶解して調製し、BrdU 溶液はろ過フィルター(MILLEX®-HV、MILLIPORE 等)で濾過滅菌した後、投与日まで-20℃以下のフリーザーで凍結保存する。

§7 BrdU の投与 (第5日目の操作)

最終感作の約48時間後に、注射針と注射筒を用いて、各マウスに BrdU 溶液 0.5 mL を1回腹腔内投与する。BrdU 溶液は事前に溶解し室温に戻しておく。その際、析出がみられる場合は約37℃のウォーターバス等で加温し、析出物を完全に溶解した後を使用する。

§8 耳介リンパ節の採取

- 8.1) マウスの体重を測定して所定の用紙に記録する(最小単位: 0.1g)。
- 8.2) BrdU 投与の約24時間後に、マウスを頸椎脱臼(またはエーテル過麻酔等)によって安楽死させる。
- 8.3) マウスを仰臥位にして下顎から頸部までを、70%エタノールで消毒する。
- 8.4) 下顎から頸部まで正中線に沿って切皮後、皮下組織を剥離し、耳介下までを露出させる。
- 8.5) 耳の直下の耳介リンパ節を採取する。リンパ節は左右それぞれに1~2個あるので見落とさないように注意する。(図2を参照)

Figure 1. Lateral Dissection



Figure 2. Ventral Dissection

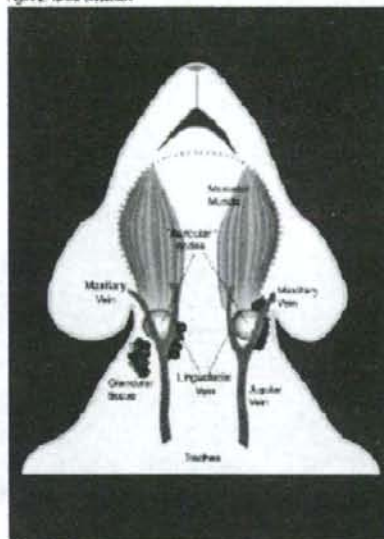


図2 耳介リンパ節の解剖学的位地

8.6) 耳介リンパ節から余分な脂肪組織を丁寧に取り除き、重量を測定した後、1.5 mL チューブに1個体分ずつ入れ、 -20°C 以下のフリーザー中で凍結保存する。

§9 BrdU 取り込み量の測定

9.1) キット試薬の調製

1) Anti-BrdU-POD 液

1) パイアルの Anti-BrdU-POD に 1.1 mL の蒸留水を加え、10 分間放置後、十分に混ぜ、Antibody dilution solution で 100 倍希釈する。

2) Washing solution 液

Washing buffer concentrate を蒸留水で 10 倍希釈する。

3) 1M 硫酸

市販の濃硫酸を蒸留水で希釈し、1M 溶液を調製する。市販の 1M 硫酸を用いても良い。

9.2) 細胞浮遊液の調製

1) プラスチック容器に生理食塩液を 15 mL 用意する。(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、陰性対照ウェルの吸光度が 0.1-0.2 となる条件を採用する。ここでは 15 ml にメスアップする場合の手順について記載する。)

2) リンパ節の入った 1.5 mL チューブに、300 μL 程度の生理食塩液を加え、ペレットベッスルでつぶしながらリンパ球を分散させ、浮遊液を作る。

3) 50 mL 遠心管にナイロンメッシュを取り付けて懸濁液を濾した後、パスツールピペット等を用い、残りの生理食塩液で 1.5 mL チューブを洗いこみ、最終容量 15 mL の細胞浮遊液を作る。

注 1: 2 枚のスライドガラスのスリ部分を利用して物理的に破碎・懸濁させてもよいが、その場

合も細胞浮遊液の最終容量は 15 mL となるようにする。

注 2：リンパ節は、採取後凍結保存して 2 週間以内に解凍して測定を実施する。

9.3) 測定準備及び測定

- 1) 各個体の細胞浮遊液はボルテックスミキサーで数秒間攪拌し、均一に分散させた後、直ちに 96 穴プレート中の 3 穴に、それぞれ 100 μ L を分注する。さらにプレート毎に 3 ウェルに生理食塩液のみを加え、以下同様の処理を行い、Blank とする。
- 2) 分注の終わったプレートを 300×G で、10 分間遠心する。
- 3) 上清を吸引除去する。その際、細胞まで吸引しないために、吸引量を全量の 3/4 程度とする。
- 4) 蓋をかぶせない状態で、温風式乾燥機等でプレートを水分が完全に無くなるまで十分に乾燥させる。
- 5) プレート底面が完全に乾燥していることを確認した後、送られたキットに含まれている Fix Denat 200 μ L 添加し、30 分間静置する。
- 6) Fix Denat を捨て、ペーパータオルの上でタッピングを行い Fix Denat を十分に除去する。
- 7) プレートに Anti-BrdU-POD 液を 100 μ L 添加し室温で 1 時間放置する。
- 8) Anti-BrdU-POD 液を捨て、ペーパータオルの上でタッピングを行い Anti-BrdU-POD 液を十分に除去する。
- 9) Washing solution を 200 μ L 添加し、プレートの中でピペッティングを、1 穴当たり 10 回を行い、タッピングにより液を捨てる操作を 3 回繰り返す。
- 10) キットに含まれる TMB 発色基質を 100 μ L 添加し、机の引出し等の暗所に入れ、15 分間放置する。
- 11) 放置後、マイクロプレートリーダーで、測定波長を 370nm、参照波長を 492nm とした 2 波長測定を行い、プレート毎に Blank ウェルの平均吸光度を全測定値から差し引いた後、測定波長の吸光度から参照波長の吸光度を差し引いた数値を試料吸光度（試料吸光度 = (測定波長吸光度_{370nm} - Blank 吸光度_{370nm}) - (参照波長吸光度_{492nm} - Blank 吸光度_{492nm})) とする。フィルターの関係等で 450 nm を測定波長とする場合は、1M 硫酸の反応停止液を 1 穴当たり 25 μ L 添加した後、690 nm を参照波長として 2 波長測定を行う（試料吸光度 = (測定波長吸光度_{450nm} - Blank 吸光度_{450nm}) - (参照波長吸光度_{690nm} - Blank 吸光度_{690nm}))。なお、使用機器の関係で所定の波長が使用できない場合は指定された波長に最も近いものを用いることとし、使用した波長の記録を残す。

注：本実験時には原則として 1 枚目のプレート第 1 群 (AOO) 及び第 2 群 (陽性対照) を割り付け、2 枚目のプレートに第 3 群 (溶媒) とその他の群を割り付けることとする。3 物質以上の実験を行う場合は 3 物質目を 1 枚目のプレートに割り付けることとする。この場合には、1 枚目のプレートにも第 3 群 (溶媒) を同時に割り付けることとする。なお、3 回繰り返し実験の測定は同時には行わず、独立して 3 回実施することとする。

9.4) 測定に用いなかった細胞浮遊液の保管

測定に用いなかった細胞浮遊液は 24 時間冷蔵保管する。24 時間以内であれば再測定を行って差し支えない。

9.5)実験の成立条件

プレート毎に陰性対照ウェルの吸光度が0.1-0.2の範囲にあること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、再測定を行う。なお、予め数段階の希釈懸濁液（15ml 懸濁液を生理食塩液で2倍、3倍等に希釈した浮遊液）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こととする。

§ 10 データの入力及び担当者への送付

1日目および6日目の体重測定値、リンパ節重量測定値、吸光度を所定のエクセルファイルに記入し、データ管理解析担当者（寒水孝司「sozu@medstat.med.osaka-u.ac.jp」）に送付する。

GLP 準拠で指定されているデータは紙ベースのコピーで、「〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2 大阪大学大学院医学系研究科 J6 寒水孝司」宛に送付する。

§ 11 参考文献

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

表1 実験機器・器具、試薬リスト

本実験には以下の機器・器具、試薬を使用する。実行委からの送付物以外は自施設で準備する。

実行委からの送付物

ペレットベッセル付 1.5 mL チューブ*	120 本	BEL-ART PRODUCTS	Pestles & Tubes, Cat No. 19923-0000
ナイロンメッシュ*	120 個	FALCON	セルストーナ, Cat No. REF352350
20 mL プラスチック容器*	120 本	アシスト	No.60.9922.113
50 mL 遠心管	120 本	FALCON	セルストレーナーと合うものであれば可
96 well ELISA 用マイクロプレート (96穴プレート)	10 枚	コーニング	3585 細胞培養用であれば特に指定はしない。
蒸留水	1 本	株式会社 大塚製薬工場	抗体調製用 滅菌済みのもの
生理食塩液	8 本	株式会社 大塚製薬工場	Cas.No. 03-172703-B, 500mL
測定キット	1 セット	Roche Applied Science	Cell Proliferation ELISA, BrdU(colorimetric) 抗 BrdU 抗体, FIX DENAT 液、洗浄液、発色基質が含まれる
BrdU (5-Bromo-2'deoxyuridine)	1 本	ナカライテスク株式会社	05650-11 (1g)
濾過滅菌用フィルター	5 個	ミリポア	MILLEX-HV

LLNA-BrU法バリデーション研究(第2期)
本実験実施日程希望調査表

2007年8月31日
ダイセル化学工業(株) 出原賢治

実験番号	入荷週	実験開始週	実験終了週	入荷週齢	入荷動物数	実施施設数	ダイセル	国立衛研	食薬センター	大塚製薬	大正製薬	富士フィルム	安評センター
本実験1	9月24日	10月1日	10月8日	8週齢	0匹	0施設							
本実験2	10月1日	10月8日	10月15日	8週齢	0匹	0施設							
本実験3	10月8日	10月15日	10月22日	8週齢	72匹	2施設	○						◎
本実験4	10月15日	10月22日	10月29日	8週齢	108匹	3施設	○	○	◎		○		
本実験5	10月22日	10月29日	11月5日	8週齢	72匹	2施設	○				○		
本実験6	10月29日	11月5日	11月12日	8週齢	72匹	2施設			◎				◎
本実験7	11月5日	11月12日	11月19日	8週齢	72匹	2施設	○					◎	
本実験8	11月12日	11月19日	11月26日	8週齢	144匹	4施設			◎	◎	○	◎	
本実験9	11月19日	11月26日	12月2日	8週齢	144匹	4施設		○	◎	◎		◎	◎
本実験10	11月26日	12月2日	12月10日	8週齢	72匹	2施設		○		◎			

◎ : 希望
○ : 可能
× : 不可

1施設あたり36匹を使用する場合、同一の週に4施設まで実施が可能です。
「入荷週」は、便宜上月曜日の日付を記載しましたが、入荷曜日は施設によって異なります。
実験開始週、実験終了週も月曜日の日付を記載しました。日程のイメージは、「実験カレンダー」を参照してください。
入荷動物にはサービスマンが1匹付きます。即ち、発注は36匹、実際の入荷は37匹となります。

LLNA-BrdU法 本実験用データシート(第1期)

塗りつぶされたセルにデータを入力してください

実験施設名	化研研	投与開始日	月	日
記録者名		データ入力最終確認日	月	日

	群 番号	群内 番号	体重(g)		リンパ節 重量(mg)	吸光度			吸光度 個体平均	吸光度 群内平均	Si値
			1日目	6日目		1系統	2系統	3系統			
溶媒 (陽性対照用)	1	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		3							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		4							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
陽性対照	2	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		3							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		4							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
溶媒 (被験物質用)	3	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		3							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		4							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
被験物質 B 低濃度	4	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		3							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		4							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
被験物質 B 中濃度	5	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		3							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		4							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
被験物質 B 高濃度	6	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		3							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		4							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
被験物質 L 低濃度	7	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		3							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		4							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
被験物質 L 中濃度	8	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		3							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		4							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
被験物質 L 高濃度	9	1							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		2							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		3							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		4							#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

体重、リンパ節重量は小数点以下1桁まで入力してください

吸光度は参照波長の値を引いた値を小数点以下3桁まで入力してください

吸光度が測定限界値を超えたときは、限界値を入力し、その旨を下記のコメント欄に入力してください

データが欠測となった場合はピリオド「.」を入力して、理由をコメント欄に入力してください

コメントがあれば枠内に入力してください

皮膚感受性試験代替法 (LLNA-BrdU法)
バリデーション研究

LLNA-BrdU法 データシート入力の手引き

2006年10月18日版

大阪大学臨床医工学融合研究教育センター
日本動物実験代替法学会
バリデーション委員会委員

寒水孝司 (Sozu Takashi)

目次

- データシートの種類とイメージ
- 入力前の確認事項
- 入力方法
- 入力上の注意事項
- LLNA-DA法のバリデーション研究で生じた問題事項
- データシートの送付先

本テキストは予備実験と本実験の両者を対象としています

2

データシートの種類

- 予備実験用
- 本実験用
- 使用ソフト
 - Windows XP
 - Office Excel 2003
- 各担当者にメールにて送付

3

データシートのイメージ (予備実験用)

LLNA-BrdU法 予備実験用データシート
動物実験施設名: _____ 実験実施日: _____

実験施設名	動物種別		性別		年齢		体重		飼育環境		飼育期間	
	種別	性別	性別	性別	年齢	年齢	体重	体重	飼育環境	飼育環境	飼育期間	飼育期間
実験施設名	1								動物 1	動物 2	動物 3	動物 4
	2								動物 5	動物 6	動物 7	動物 8
	3								動物 9	動物 10	動物 11	動物 12
	4								動物 13	動物 14	動物 15	動物 16
実験施設名	1								動物 17	動物 18	動物 19	動物 20
	2								動物 21	動物 22	動物 23	動物 24
	3								動物 25	動物 26	動物 27	動物 28
	4								動物 29	動物 30	動物 31	動物 32

※ 動物 1～32 は、動物 1～32 の順に記入してください。
 ※ 動物 1～32 は、動物 1～32 の順に記入してください。
 ※ 動物 1～32 は、動物 1～32 の順に記入してください。
 ※ 動物 1～32 は、動物 1～32 の順に記入してください。

4

データシートのイメージ (本実験用)

シートは
複数あります

LLNA-BrdU法 本実験用データシート (第1期)

実験施設名	動物種別		性別		年齢		体重		飼育環境		飼育期間	
	種別	性別	性別	性別	年齢	年齢	体重	体重	飼育環境	飼育環境	飼育期間	飼育期間
実験施設名	1								動物 1	動物 2	動物 3	動物 4
	2								動物 5	動物 6	動物 7	動物 8
	3								動物 9	動物 10	動物 11	動物 12
	4								動物 13	動物 14	動物 15	動物 16
実験施設名	1								動物 17	動物 18	動物 19	動物 20
	2								動物 21	動物 22	動物 23	動物 24
	3								動物 25	動物 26	動物 27	動物 28
	4								動物 29	動物 30	動物 31	動物 32

※ 動物 1～32 は、動物 1～32 の順に記入してください。
 ※ 動物 1～32 は、動物 1～32 の順に記入してください。
 ※ 動物 1～32 は、動物 1～32 の順に記入してください。
 ※ 動物 1～32 は、動物 1～32 の順に記入してください。

5

入力前の確認事項(1)本実験

- 実験施設名に間違いがないか
- シート数に間違いがないか
 - 国立衛研 2枚(第1期・第2期)+1枚(再測定)
 - その他の施設 3枚(第1期・第2期・第3期)+1枚(再測定)

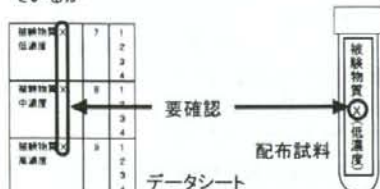
22	実験施設名 A	4	1
23	飼育環境	2	2
24	動物種別	2	2

要確認

6

入力前の確認事項(2)本実験

- データシート上の被験物質コード(アルファベット)と実際の配布試料のラベルのコードが一致しているか



入力方法(1)

- 実験施設名
 - 予備実験: 選択式
 - 本実験: 事前入力(内容を確認)
- 記録者名
 - 記入式(例: 代替 功)
- 投与開始日
データ入力最終確認日(月・日)
 - 選択式

入力方法(2)

- 体重(g)
 - 記入式, 小数点以下1桁, 範囲(10.0~50.0)
- リンパ節重量(mg)
 - 記入式, 小数点以下1桁(2桁目まで入力しても構いませんが, 解析は小数点以下1桁までしか使用しません), 範囲(0.0~50.0)
- 吸光度
 - 記入式, 小数点以下3桁, 範囲(0.000~3.000)
 - 参照波長の測定値を引いた値を入力してください
 - 値がマイクロプレートリーダーの測定限界値を超えたときは, 測定限界値を入力し, その旨をコメント欄に入力してください

入力上の注意事項(1)

- 色つきのセルに必要なデータを入力・選択してください(それ以外のセルは入力・選択できません)
 - 行・列の追加・削除, シート名の変更, 保護の解除は行わないでください
- セルを選択するとコメントが表示されます
 - 日本語の記入は全角文字, 数字とアルファベットは半角文字にしてください

入力上の注意事項(2)

- 体重, リンパ節重量, 吸光度のデータが欠測となった場合は「J」(半角ピリオド)を入力して, その理由をコメント欄に入力してください
- 特記事項は, コメント欄に入力してください
- 吸光度の平均, 群内平均, SI値はデータシート上で自動計算されます

入力上の注意事項(3)

- 陰性対照(溶媒)の平均吸光度が0.2を超えたために再測定を行った場合は, 再測定用のデータシートで「投与開始日」の代わりに該当する「実験期間(第1期, 第2期, 第3期)」を入力(選択)してください
 - 細胞液を更に希釈した場合は, 希釈率をコメント欄に入力してください
 - 再測定を行った旨を, 該当するデータシートのコメント欄に入力してください
 - 再測定用のデータシートで「投与開始日」の代わりに該当する「実験期間(第1期, 第2期, 第3期)」を入力(選択)してください

LLNA-DA法のバリデーション研究で生じた問題事項

- 古いバージョンのデータシートの使用
- データ入力最終確認日の未入力
- 群番号と被験物質の非対応
- 記録用紙のデータの転記ミス

13

もう一度確認してください

- データを送付する際には、色つきのセルに必要なデータが入力・選択されているかを再度確認してください
- 記録用紙とデータシートの内容が合っているかを確認してください
- データシートのファイル名はこちらで変更しますので、特に気にしないでください
- 記録用紙はコピーを送ってください

14

データシートの送付先

- 寒水孝司
- Email: sozu@medstat.med.osaka-u.ac.jp
- 〒565-0871
大阪府吹田市山田丘2-2
大阪大学大学院医学系研究科 J6
(内科系臨床医学専攻 情報統合医学講座 医学統計学)
- TEL: 06-6879-3597

15

SI 値とその 95%信頼区間の計算法

2007年2月23日

大森 崇, 寒水 孝司

LLNA-DA 法では、感作性の判定に被験物質群の平均 ATP 発光量をその被験物質の溶媒群の平均 ATP 発光量で除した指標である Stimulation index (SI 値) を用いる。ここでは LLNA-DA 法バリデーション研究で採用した SI 値の 95% 信頼区間の構成法について記載する。

被験物質群を示す記号を Y、溶媒群を示す記号を X で表すことにし、1 回の実験の被験物質群、溶媒群の平均 ATP 発光量をそれぞれ Mean(Y)、Mean(X)、ATP 発光量の標準偏差をそれぞれ SD (Y)、SD (X)、個体数をそれぞれ N(Y)、N(X) とする。これらの記号を用いたとき SI 値は

$$\text{SI 値} = \frac{\text{Mean}(Y)}{\text{Mean}(X)} \quad (1)$$

となる。SI 値の推定量の分散を Var(SI 値) とすると、この計算にはしばしば

$$\text{Var}(\text{SI 値}) = \frac{\text{SD}(Y)^2}{N(Y) \times \text{Mean}(X)^2} \quad (2)$$

が用いられる。しかしながら、この分散の計算では (1) 式の分子である被験物質群のばらつきだけが反映されており、分母である溶媒群のばらつきは考慮されていない。つまり、この方法で分散を計算すると SI 値の小さなところでは SI 値のばらつきを過小評価する可能性がある。

これを回避するための一つの方法は、まずデルタ法で対数変換後の SI 値の分散を計算し、得られた値を用いて再びデルタ法により SI 値の分散を計算することであろう。

デルタ法によって得られる対数変換後の SI 値の分散を Var(ln SI 値) とすると、

$$\text{Var}(\ln \text{SI 値}) = \frac{\text{SD}(Y)^2}{N(Y) \times \text{Mean}(Y)^2} + \frac{\text{SD}(X)^2}{N(X) \times \text{Mean}(X)^2} \quad (3)$$

となるので、(3)式を用いてデルタ法を適用したときの Var(SI 値)は

$$\text{Var}(\text{SI 値}) = (\text{SI 値})^2 \times \text{Var}(\ln \text{SI 値}) \quad (4)$$

となる。

SI 値の 95%信頼区間は、

$$SI \pm 1.96 \times \sqrt{\text{Var}(SI \text{値})} \quad (5)$$

として得ることもできるが、(5)式による信頼区間の計算法では、信頼区間の下限が 0 より小さくなる可能性がある。この問題を回避する方法の一つは、対数変換後の SI 値の信頼区間を作り、指数をとることである。つまり、

$$\exp(\ln(SI \text{値}) \pm 1.96 \sqrt{\text{Var}(\ln SI \text{値})}) \quad (6)$$

である。この 95%信頼区間は、SI 値の推定値について左右対称の区間ではないものの、信頼区間の下限は 0 より大きくなる。

LLNA・DA 法バリデーション研究では、(3) 式による対数変換後の SI 値の分散の計算に基づいた (6) 式の 95%信頼区間を採用した。

希釈・再実験の実施状況

1 解析データ

1.1 細胞浮遊液の容量と希釈倍率の表記法

細胞浮遊液の基準容量は SOP に準拠して 15mL とし、この容量を基準に、次のように希釈倍率を表記する。

表 1: 容量と希釈倍率の関係

容量 (ml)	10	13	15	20	22.5	30	45	60
希釈倍率 (倍)	2/3	13/15	1	4/3	3/2	2	3	4
	(0.67)	(0.87)		(1.33)	(1.50)			

1.2 データ採否の基準

本研究では、次のようなデータ採否の基準を設定する。

データ採否 (1): 実験開始前に合意された SOP (Version 1.03 改訂 071012) に準拠する基準

- 希釈・再実験のデータを使用する
- 溶媒の吸光度の群内平均が「0.1-0.2」に収まるもの
- 陽性対照の SI 値が 2 未満の結果は採用しない

データ採否 (2): 実験終了後の実行委員会 (2008 年 2 月 15 日) 以降に合意された基準

- 希釈・再実験のデータを使用しない
- 溶媒の吸光度の群内平均の範囲に制限を設けない
- 陽性対照の SI 値が 2 未満の結果は採用しない

2つのデータ採否の基準の相違点は表 2 に示す通りである。「陽性対照の SI 値が 2 未満の結果は採用しない」というのは両者に共通の基準である。

表 2: データ採否の基準

	採否 (1)	採否 (2)
希釈・再実験のデータ	使用する	使用しない
溶媒の吸光度の群内平均	0.1-0.2 の範囲内	制限なし
(採否基準の合意の時期)	実験開始前	実験開始後

1.3 希釈・再実験の実施状況

陽性対照用の溶媒と被験物質用の溶媒のそれぞれについて、吸光度の群内平均を施設・実験時期(第1期・第2期・第3期)ごとに整理すると表3~9が得られる。表中のデータ採否(1),(2)の列において、「○」は採否、「△」は非実施による非採否、「×」は適合外による非採否を表す。ただし、解析結果でデータの採否を示すときは、「△」と「×」は区別せず、いずれも「×」として示す。

表A-1 希釈・再実験の状況

施設1

第1期	1回目	再測定	再々測定	データ採否(1)	データ採否(2)
陽	0.209	→ 0.198		×	○
	10ml(2/3)	15ml(1)		(SI < 2)	
被	0.302	→ 0.228	→ 0.538	×	○
	10ml(2/3)	15ml(1)	20ml(4/3)	(範囲外 かつ SI < 2)	
第2期					
第2期	1回目	再測定		データ採否(1)	データ採否(2)
陽	0.056	→ 0.115		○	○
	15ml(1)	10ml(2/3)		(再測定)	
被	0.157			○	○
H B	15ml(1)			(1回目)	
第3期					
第3期	1回目	再測定		データ採否(1)	データ採否(2)
陽	0.082	→ 0.128		○	○
	15ml(1)	10ml(2/3)		(再測定)	
被	0.107			○	○
F J	15ml(1)			(1回目)	

施設2

基準となる細胞浮遊液の容量が記載されていないので、原液を15mlと仮定して記載する。参考データは、本来得られないデータであるため、解析の対象としない。データ採否(2)で「×」なのは、陽性対照のSI値が2未満であるためである。

第1期	1回目	再測定	参考データ	データ採否(1)	データ採否(2)
陽	0.324	→ 0.089	0.277	×	×
	15ml(1)	30ml(2)	15ml(1)	(範囲外 かつ SI < 2)	(SI < 2)
被	0.307	→ 0.041	0.132	×	×
H B	15ml(1)	30ml(2)	15ml(1)	(範囲外 かつ SI < 2)	(SI < 2)
第2期					
第2期	1回目		参考データ	データ採否(1)	データ採否(2)
陽	0.131		0.090	○	○
	15ml(1)		30ml(2)	(1回目)	
被	0.178		0.108	○	○
E D	15ml(1)		30ml(2)	(1回目)	
第3期					
第3期	1回目		参考データ	データ採否(1)	データ採否(2)
陽	0.174		0.109	○	○
	15ml(1)		30ml(2)	(1回目)	
被	0.173		0.106	○	○
C G	15ml(1)		30ml(2)	(1回目)	

施設 3

第 1 期	1 回目	再測定	再々測定	データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.241	→ 0.134		○	○
	10ml(2/3)	15ml(1)		(再測定)	
被	0.220	→ 0.199		○	○
	G E 10ml(2/3)	15ml(1)		(再測定)	
第 2 期	1 回目	再測定	再々測定	データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.203	→ 0.164		○	○
	15ml(1)	20ml(4/3)		(再測定)	
被	0.266	→ 0.049	→ 0.197	○	○
	H B 15ml(1)	30ml(2)	30ml(2)	(再々測定)	
第 3 期	1 回目	再測定	再々測定	データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.316	→ 0.369	→ 0.125	×	○
	15ml(1)	60ml(4)	60ml(4)	(SI < 2)	
被	0.221	→ 0.239	→ 0.200	×	○
	I A 15ml(1)	30ml(2)	30ml(2)	(SI < 2)	

施設 4

第 1 期	1 回目	再測定	再々測定	データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.281	→ 0.055	→ < 0.1	×	○
	15ml(1)	30ml(2)	22.5ml(3/2)	(範囲外)	
被	0.271	→ 0.050	→ < 0.1	×	○
	E D 15ml(1)	30ml(2)	22.5ml(3/2)	(範囲外)	
第 2 期	1 回目	再測定		データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.224	→ 非実施		△	○
	15ml(1)				
被	0.241	→ 非実施		△	○
	B H 15ml(1)				
第 3 期	1 回目	再測定		データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.154			○	○
	22.5ml(3/2)			(1 回目)	
被	0.210	→ 非実施		△	○
	I A 22.5ml(3/2)				

施設 5

基準となる細胞浮遊液の容量が記載されていないので、原液を 15ml と仮定して記載する。

第 1 期	1 回目	再測定	再々測定	データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.126			○	○
	13ml(13/15)			(1 回目)	
被	0.052	→ 非実施		△	○
J F	13ml(13/15)				

第 2 期	1 回目			データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.161			○	○
	13ml(13/15)			(1 回目)	
被	0.150			○	○
E D	13ml(13/15)			(1 回目)	

第 3 期	1 回目	再測定		データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.112			○	○
	13ml(13/15)			(1 回目)	
被	0.055	→ 非実施		△	○
B H	13ml(13/15)				

施設 6

第 1 期	1 回目	再測定	再々測定	データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.150			○	○
	15ml(1)			(1 回目)	
被	0.253	→ 非実施		△	○
H B	15ml(1)				

第 2 期	1 回目			データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.183			○	○
	15ml(1)			(1 回目)	
被	0.163			○	○
F J	15ml(1)			(1 回目)	

第 3 期	1 回目	再測定		データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.304	→ 0.178		○	○
	15ml(1)	20ml(4/3)		(再測定)	
被	0.210	→ 0.134		○	○
C E	15ml(1)	20ml(4/3)		(再測定)	