

- ⑥ プレートの端を軽くタッピングしてウェル内の液を混合し、Plate Covers でプレートをカバーして 2 時間室温で静置します。
- ⑦ 2 時間静置後、Plate Covers をあけて、適切な容器（例えば滅菌缶）上でプレートを軽く振ることにより、プレート内の添加液を廃棄します。  
\*強く振るとストリップがフレームから外れますので注意してください。
- ⑧ ELISA 洗浄液を各ウェルに 400 $\mu$ L 加え、プレートを軽く振ることにより廃棄し、キムタオル上でプレートを強めにたたいて、ウェル内の ELISA 洗浄液を極力除去します。  
この洗浄操作を 4 回繰り返して行い、ウェル内を完全に洗浄します。
- ⑨ ①～⑧の作業について、必要事項を作業記録シート 6 に記録します。

### 3.2.6.3 HRP 希釈液の添加

- ① HRP 希釈液を 100 $\mu$ L ずつ各ウェルに添加します。
- ② Plate Covers でプレートをカバーして 30 分間室温で静置します。
- ③ 30 分間静置後、Plate Covers をあけて、適切な容器（例えば滅菌缶）上でプレートを軽く振ることにより、プレート内の添加液を廃棄します。  
\*強く振るとストリップがフレームから外れますので注意してください。
- ④ ELISA 洗浄液を各ウェルに 400 $\mu$ L 加え、プレートを軽く振ることにより廃棄し、キムタオル上でプレートを強めにたたいて、ウェル内の ELISA 洗浄液を極力除去します。  
この洗浄操作を 4 回繰り返して行い、ウェル内を完全に洗浄します。
- ⑤ ①～④の作業について、必要事項を作業記録シート 6 に記録します。

### 3.2.6.4 基質による発色と反応停止

- ① Stabilized Chromogen を 100 $\mu$ L ずつ各ウェルに添加します。
- ② 15 分間、室温暗所で静置します。
- ③ 15 分間静置後、Stop solution を 100 $\mu$ L ずつ各ウェルに添加します。  
プレートの端を軽くタッピングしてウェル内の液を混合します。
- ④ ①～③の作業について、必要事項を作業記録シート 6 に記録します。

### 3.2.6.5 吸光度測定と IL-1 $\alpha$ 産生量を計算

- ① 96 ウェルマルチプレートリーダーを用いて、450nm の吸光度を測定します。
- ② IL-1 $\alpha$  標準液（希釈系列）の吸光度測定値から標準曲線（両対数）を作成します。
- ③ 標準曲線から、注射用水（陰性対照）、あるいは各被験物質の培養上清中の IL-1 $\alpha$  産生量を算出します。
- ④ 下記式より IL-1 $\alpha$  産生量を計算します。

IL-1 $\alpha$ 産生量 (pg/組織) = 被験物質の IL-1 $\alpha$ 産生量 (pg/mL) x 1 (mL: 後培養培地量)

- ⑤ ①～④の作業について、必要事項を作業記録シート 6 に記録します。

### 【フローチャート 1】IL-1 $\alpha$ ELISA 実験操作 フローチャート

- ① IL-1 $\alpha$ 標準液、Standard Diluent Buffer (ブランク)、各被験物質を添加 (各 50 $\mu$ L)  
Incubation Buffer (50 $\mu$ L) を添加  
HuIL-1 $\alpha$  Biotin conjugate (50 $\mu$ L) を添加

↓ 2 時間 室温で静置

- ② ウェル内添加液を廃液、ELISA 洗浄液 (400 $\mu$ L) で 4 回洗浄  
HRP 希釈液 (100 $\mu$ L) を添加

↓ 30 分間 室温で静置

- ③ ウェル内添加液を廃液、ELISA 洗浄液 (400 $\mu$ L) で 4 回洗浄  
Stabilized Chromogen (100 $\mu$ L) を添加

↓ 15 分間 室温暗所で静置

- ④ Stop solution (100 $\mu$ L) を添加

- ⑤ 450nm の吸光度を測定

## 4. 評価

### 4.1 試験成立条件

本法における試験成立条件は、下記条件にいずれも適合する場合とします。

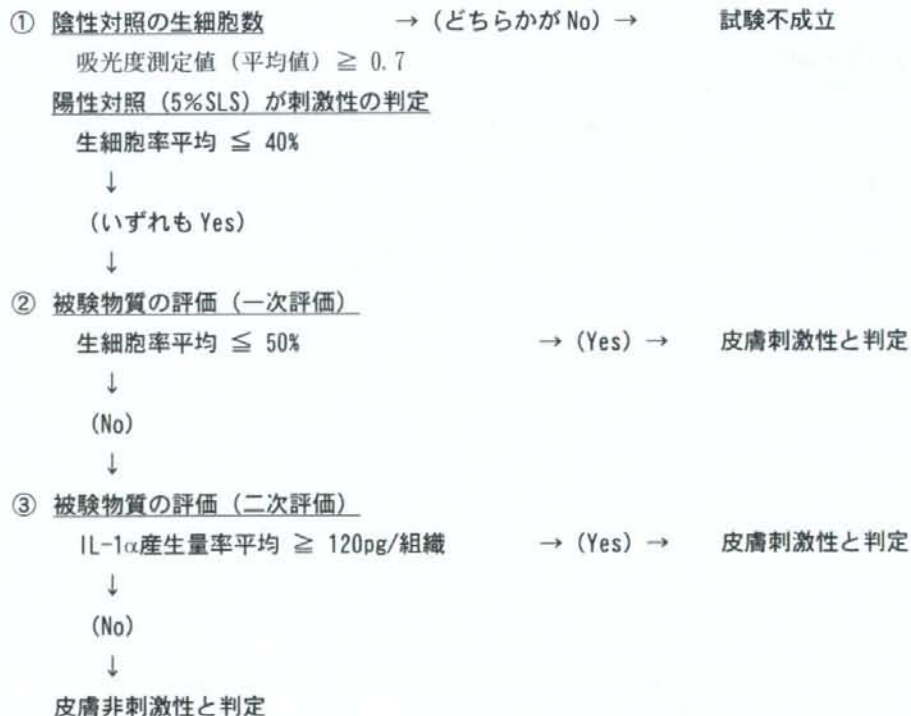
- ・ 生細胞数： 陰性対照の吸光度測定値平均  $\geq 0.7$
- ・ 陽性対照： 5%SLS（陽性対照）の生細胞率平均  $\leq 40\%$

### 4.2 判定基準

本法における判定基準を示します。

生細胞率（一次評価）	IL-1 $\alpha$ ELISA（二次評価）	判定
生細胞率平均 $\leq 50\%$	IL-1 $\alpha$ 産生量平均 $\geq 120\text{pg}/\text{組織}$	刺激性
生細胞率平均 $> 50\%$		
生細胞率平均 $> 50\%$	IL-1 $\alpha$ 産生量平均 $< 120\text{pg}/\text{組織}$	非刺激性

#### 【フローチャート2】判定フローチャート



作業記録シート1: LabCyte EPI-MODEL24 受領記録

MDS1: Acceptance record of LabCyte EPI-MODEL24

施設名: \_\_\_\_\_ 試験名: \_\_\_\_\_ 試験番号: \_\_\_\_\_  
 Laboratory name Test name Test No.

1. LabCyte EPI-MODEL24

受領日: \_\_\_\_\_  
 Date of acceptance

ロット番号: \_\_\_\_\_  
 Lot No.

使用期限: \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日  
 Expiration date

付属品: アッセイ培地 30mL  (ロット番号: \_\_\_\_\_ 使用期限: \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日)  
 Accessories Assay medium, 30mL Lot No. Expiration date  
 24ウェルアッセイプレート   
 24 well assay plate

特記事項 Note

2. アッセイ培地

Assay medium

受領日: \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日  
 Date of acceptance

ロット番号: \_\_\_\_\_  
 Lot No.

使用期限: \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日  
 Expiration date

特記事項 Note

記録日: \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日 試験担当者: \_\_\_\_\_ 確認日: \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日 試験責任者: \_\_\_\_\_  
 Date Operator Check date Study director

事務局確認 確認日: \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日 氏名: \_\_\_\_\_  
 Secretariat Check date Date

## 作業記録シート 2: 培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 の準備 (3.2.1 項)

MDS2: Pre-incubation of LabCyte EPI-MODEL24 (Section 3.2.1)

施設名: \_\_\_\_\_ 試験名: \_\_\_\_\_ 試験番号: \_\_\_\_\_  
Laboratory name Test Name Test No.

## 1. アッセイ培地を温め、24 ウェルアッセイプレート第 1 行に 0.5mL ずつ添加する。

Warm up the assay medium and add 0.5mL of the assay medium in wells of 1st line of 24-well assay plate.

アッセイ培地: \_\_\_\_\_ (ロット番号: \_\_\_\_\_) 使用期限: \_\_\_\_\_ 年 月 日)  
Assay medium Lot No. Expiration date約 30 分間加温 To warm for 30 min. 0.5mL ずつ添加 To add 0.5mL of assay medium to each well プレート数: \_\_\_\_\_  
Number of plate(s)

## 2. 培養表皮モデルを取り出し、24 ウェルアッセイプレート第 1 行に移す。

Transfer LabCyte EPI-MODEL24 1st line of 24-well assay plate.

LabCyte EPI-MODEL24: \_\_\_\_\_ (ロット番号: \_\_\_\_\_) 使用期限: \_\_\_\_\_ 年 月 日)  
Lot No. Expiration date

作業日時: \_\_\_\_\_ 年 月 日 \_\_\_\_\_

Operation date

培養カップ底面に気泡が無いことを確認 

To confirm that there is no bubble under the cell culture insert.

3. CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れ、被験物質暴露まで一晩静置する。LabCyte EPI-MODEL24 is cultured in CO<sub>2</sub> incubator overnight.

培養開始日時: \_\_\_\_\_ 年 月 日 \_\_\_\_\_

Time/date of culture start

被験物質暴露予定日時: \_\_\_\_\_ 年 月 日 \_\_\_\_\_

Planned time/date of test substance treatment

特記事項 Note

記録日: \_\_\_\_\_ 年 月 日 試験担当者: \_\_\_\_\_ 確認日: \_\_\_\_\_ 年 月 日 試験責任者: \_\_\_\_\_  
Date Operator Check date Study director事務局確認 確認日: \_\_\_\_\_ 年 月 日 氏名: \_\_\_\_\_  
Secretariat Check date Date

## 作業記録シート 3/1: 被験物質の適用と洗浄、後培養 (3.2.2項~3.2.3項)

MDS3/1: Test substance application, washout and post-incubation of LabCyte EPI-MODEL24 (Section 3.2.2 to 3.2.3)

施設名: \_\_\_\_\_ 試験名: \_\_\_\_\_ 試験番号: \_\_\_\_\_  
 Laboratory name Test name Test No

## 1. 陽性対照物質の調製 Preparation of positive control.

SLS の秤量 \_\_\_\_\_ mg 調製量 \_\_\_\_\_ mL 作業日時: \_\_\_\_\_ 年 月 日 : \_\_\_\_\_  
 Weight of SLS Preparation vol. Operation date

## 2. アッセイ培地を温め、24 ウェルアッセイプレート第3行に 1.0mL ずつ添加する。

Warm up the assay medium and add 1.0mL of the assay medium in wells of 3rd line of 24-well assay plate  
 アッセイ培地: (ロット番号: \_\_\_\_\_ 使用期限: \_\_\_\_\_ 年 月 日)  
 Assay medium Lot No Expiration date  
 約 30 分間加温  1.0mL ずつ添加  作業日時: \_\_\_\_\_ 月 日 : \_\_\_\_\_  
 To warm for 30 min To add 1.0mL of assay medium Operation date

## 3. 被験物質を適用する。

Apply test substances on the LabCyte EPI-MODEL24  
 作業開始日時: \_\_\_\_\_ 年 月 日 : \_\_\_\_\_ 作業終了日時: \_\_\_\_\_ 年 月 日 : \_\_\_\_\_  
 Time/date of operation started Time/date of operation done

## 4. 暴露 15 分後、培養表皮モデルを洗浄し、24 ウェルアッセイプレート第3行に移す。

After treatment of test substance for 15 min., wash out the LabCyte EPI-MODEL24 transfer the wells to 3rd line of 24-well assay plate  
 PBS: (ロット番号: \_\_\_\_\_ 使用期限: \_\_\_\_\_ 年 月 日)  
 Lot No Expiration date  
 作業開始日時: \_\_\_\_\_ 年 月 日 : \_\_\_\_\_ 作業終了日時: \_\_\_\_\_ 年 月 日 : \_\_\_\_\_  
 Time/date of operation started Time/date of operation done  
 培養カップ底面に気泡が無いことを確認 To confirm that there is no bubble under the cell culture insert.

## 5. 被験物質情報 Information of test substance

被験物質コード番号 Test substance code No	ロット 番号 Lot No	物理的性状 Physical state	適用量 Test substance vol. (weight) (秤量記録 weighting)	適用時刻 Application Time	暴露時間 Treatment period (15分 15min.)
注射用水 (陰性対照) Distilled Water (Negative control)		液体 Liquid	25 $\mu$ L	:	<input type="checkbox"/>
5% SLS (陽性対照) Positive control		液体 Liquid	25 $\mu$ L	:	<input type="checkbox"/>
		液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25 $\mu$ L. ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
		液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25 $\mu$ L. ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
		液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25 $\mu$ L. ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
		液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25 $\mu$ L. ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
		液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25 $\mu$ L. ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
		液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25 $\mu$ L. ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
		液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25 $\mu$ L. ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
		液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25 $\mu$ L. ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
		液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25 $\mu$ L. ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>

記録日: \_\_\_\_\_ 年 月 日 試験担当者: \_\_\_\_\_ 確認日: \_\_\_\_\_ 年 月 日 試験責任者: \_\_\_\_\_  
 Date Operator Check date Study director

事務局確認 確認日: \_\_\_\_\_ 年 月 日 氏名: \_\_\_\_\_  
 Secretariat Check date Date

## 作業記録シート 3/2: 被験物質の適用と洗浄、後培養 (3.2.2項~3.2.3項)

MDS3/2: Test substance application, washout and post-incubation of LabCyte EPI-MODEL24 (Section 3.2.2 to 3.2.3)

施設名: \_\_\_\_\_ 試験名: \_\_\_\_\_ 試験番号: \_\_\_\_\_  
 Laboratory name Test name Test No.

## 5. 被験物質情報 Information of test substance

被験物質コード番号 Test substance code No.	物理的性状 Physical state	適用量 Test substance vol. (weight) (秤量記録 weighing)	適用時刻 Application time	暴露時間 Treatment period (15分 15min.)
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25 $\mu$ L ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25 $\mu$ L ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25 $\mu$ L ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25 $\mu$ L ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25 $\mu$ L ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25 $\mu$ L ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25 $\mu$ L ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25 $\mu$ L ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25 $\mu$ L ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25 $\mu$ L ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>

6. CO<sub>2</sub>インキュベーターに入れ、42時間後培養する。Culture LabCyte EPI-MODEL24 in CO<sub>2</sub> incubator for 42 hrs.後培養開始日時: \_\_\_\_\_年 月 日 : \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ :  
Time/date of post-incubation started後培養終了予定日時: \_\_\_\_\_年 月 日 : \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ :  
Time/date post-incubation done

特記事項 Note

記録日: \_\_\_\_\_年 月 日 試験担当者: \_\_\_\_\_ 確認日: \_\_\_\_\_年 月 日 試験責任者: \_\_\_\_\_  
Date Operator Check date Study director事務局確認 確認日: \_\_\_\_\_年 月 日 氏名: \_\_\_\_\_  
Secretariat Check date Date

作業記録シート 4: MTT 試験と培養上清サンプリング (3.2.4 項)

MS4: MTT assay and collection of culture supernatant of LabCyte EPI-MODEL24 (Section 3.2.4)

施設名: \_\_\_\_\_ 試験名: \_\_\_\_\_ 試験番号: \_\_\_\_\_  
 Laboratory name Test name Test No.

1. MTT 培地の調製 Preparation of MTT medium  
 調製量 \_\_\_\_\_ mL ロット番号 \_\_\_\_\_ 調製日時: \_\_\_\_\_ 年 月 日 : \_\_\_\_\_  
 Preparation vol. Lot No. Operation date

2. MTT 培地を温め、24 ウェルアッセイプレート第 4 行に 0.5mL ずつ添加する。  
 Warm up the MTT medium and add 0.5mL of the MTT medium in wells of 4th line of 24-well assay plate  
 MTT 培地: (ロット番号: \_\_\_\_\_ 使用期限: \_\_\_\_\_)  
 MTT medium Lot No. Expiration date  
 約 30 分間加温  0.5mL ずつ添加  作業日時: \_\_\_\_\_ 年 月 日 : \_\_\_\_\_  
 To warm for 30 min. To add 0.5mL of the MTT medium Operation date

3. 後培養終了後、培養表皮モデルを 24 ウェルアッセイプレート第 4 行に移す。  
 After post-incubation, the LabCyte EPI-MODEL24 transfer to wells of 4th line of 24-well assay plate  
 作業開始日時: \_\_\_\_\_ 年 月 日 : \_\_\_\_\_ 作業終了日時: \_\_\_\_\_ 年 月 日 : \_\_\_\_\_  
 Time/date of operation started Time/date of operation done  
 培養カップ底面に気泡が無いことを確認 To confirm that there is no bubble under the cell culture insert.

4. 24 ウェルアッセイプレート第 3 行の培養上清全量を、1.5mL マイクロチューブにサンプリングする。  
 Transfer the whole amount of the culture supernatant at the 3<sup>rd</sup> line of 24-well assay plate to 1.5mL microtube.  
 サンプリング Collection of culture supernatant.   
 作業日時: \_\_\_\_\_ 年 月 日 : \_\_\_\_\_  
 Operation date

5. CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れ、3 時間 MTT 反応を行う。  
 LabCyte EPI-MODEL24 culture overnight in CO<sub>2</sub> incubator for 42 hrs

MTT 反応時間情報 Information of MTT reaction periods.

被験物質コード番号 Test substance code No.	ロット番号 Lot No.	MTT 反応 開始時刻 At start MTT reaction	MTT 反応 終了時刻 At end MTT reaction	被験物質コード番号 Test substance code No.	ロット番号 Lot No.	MTT 反応 開始時刻 At start MTT reaction	MTT 反応 終了時刻 At end MTT reaction
注射用水 (陰性対照) Distilled Water (Negative control)		:	:			:	:
5% SLS (陽性対照) (Positive control)		:	:			:	:
		:	:			:	:
		:	:			:	:
		:	:			:	:
		:	:			:	:
		:	:			:	:
		:	:			:	:
		:	:			:	:
		:	:			:	:

特記事項 Note

記録日: \_\_\_\_\_ 年 月 日 試験担当者: \_\_\_\_\_ 確認日: \_\_\_\_\_ 年 月 日 試験責任者: \_\_\_\_\_  
 Date Operator Check date Study director

事務局確認 確認日: \_\_\_\_\_ 年 月 日 氏名: \_\_\_\_\_  
 Secretariat Check date Date



## 作業記録シート 5: MTT 反応産物 (フォルマザン) の抽出と測定 (3.2.5 項)

MOSS Extraction of MTT formazan and analysis of OD at 450nm and 650nm (Section 3.2.5)

施設名: \_\_\_\_\_ 試験名: \_\_\_\_\_ 試験番号: \_\_\_\_\_  
 Laboratory name Test name Test No.

1. MTT 反応終了後、培養皮膚をピンセットでつまんで取り出し、1.5mL チューブに移す。

After MTT reaction, pick up the cultured epidermis from the cell culture insert and put in 1.5mL microtube.

スカルペルの使用 Did you use a scalpel for cutting out of cultured epidermis?

作業日時: \_\_\_\_\_ 年 月 日 : \_\_\_\_\_

Operation date

2. イソプロパノール 300 $\mu$ L を入れて培養表皮モデルを完全に浸漬する。

Add isopropanol (300 $\mu$ L) add in microtube and the cultured epidermis is embedded in isopropanol.

イソプロパノール ロット番号 \_\_\_\_\_ 300 $\mu$ L 添加   
 Lot No. To add isopropanol (300 $\mu$ L).

培養表皮モデルを完全に浸漬 Embedded the cultured epidermis in isopropanol.

作業日時: \_\_\_\_\_ 年 月 日 : \_\_\_\_\_

Operation date

3. 冷暗所で一晩以上静置し、色素を抽出する。Allow microtube to stand at cold and dark space for MTT formazan extraction

冷暗所に静置 Place microtube at cold and dark space

4. 抽出液 (200 $\mu$ L) を 96 ウェルプレートの各ウェルに入れる。

Extract solution (200 $\mu$ L) is transferred to each well of 96-well plate.

抽出液 200 $\mu$ L を 96 ウェルプレートに移す To be transferred 96-well plate

作業日時: \_\_\_\_\_ 年 月 日 : \_\_\_\_\_

Operation date

96 ウェル割り付け記録 Sample location on 96-well plate:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ブランク Blank											
B	注射用水-1 Distilled Water-1											
C	注射用水-2 Distilled Water-2											
D	注射用水-3 Distilled Water-3											
E	SK SLS-1											
F	SK SLS-2											
G	SK SLS-3											
H												

5. 570nm、及び 650nm の吸光度を測定し、570nm の吸光度から 650nm の吸光度を差し引いた値を測定値とする。Analyze extracts OD at 570nm and 650nm, and calculated the OD (570nm-650nm).

570nm、及び 650nm の吸光度を測定 To analyze OD at 570nm and 650nm

測定値 (570nm 吸光度-650nm の吸光度) を計算 To calculate the OD (570nm-650nm).

測定値から生細胞率を計算 To calculate cell viability.

生細胞率を別途配布するファイルに転記 Input cell viability is input to the data sheet.

データシートをプリントアウトして裏面に貼付 The data sheet is stuck on this back of the sheet.

転記ミスがないことを確認 Check of input error.

作業日時: \_\_\_\_\_ 年 月 日 : \_\_\_\_\_

Operation date

特記事項 Note

記録日: \_\_\_\_\_ 年 月 日 試験担当者: \_\_\_\_\_ 確認日: \_\_\_\_\_ 年 月 日 試験責任者: \_\_\_\_\_  
 Date Operator Check date Study director

事務局確認 確認日: \_\_\_\_\_ 年 月 日 氏名: \_\_\_\_\_  
 Secretariat Check date Date

作業記録シート6: 培養上清中のIL-1 $\alpha$ 産生量の測定 (3.2.6項)

MDS6: Quantitative analysis of IL-1 $\alpha$  contents in culture supernatant (Section 3.2.6)

施設名: \_\_\_\_\_ 試験名: \_\_\_\_\_ 試験番号: \_\_\_\_\_  
 Laboratory name Test Name Test No.

IL-1 $\alpha$  ELISA kit: (ロット番号: \_\_\_\_\_) 使用期限: \_\_\_\_\_年 月 日  
 Lot No. Expiration date

1. IL-1 $\alpha$ 標準液(希釈系列)の調製 Preparation of IL-1 $\alpha$  standard

IL-1 $\alpha$  Standardの希釈  希釈系列の作製  作業日時: \_\_\_\_\_年 月 日 : \_\_\_\_\_  
 Resolved IL-1 $\alpha$  conc. Preparation of Standard Sol. Operation date

2. HRP希釈液の調製 Preparation of HRP solution

使用ウェル数 \_\_\_\_\_ ウェル \_\_\_\_\_ 調製量 \_\_\_\_\_ mL 作業日時: \_\_\_\_\_年 月 日 : \_\_\_\_\_  
 Well No. used present assay Vol. of preparation Operation date

3. ELISA洗浄液の調製 Preparation of wash buffer

使用ウェル数 \_\_\_\_\_ ウェル \_\_\_\_\_ 調製量 \_\_\_\_\_ mL 作業日時: \_\_\_\_\_年 月 日 : \_\_\_\_\_  
 Well No. used present assay Vol. of preparation Operation date

4. 培養上清、被験物質の添加 To add unknown samples

検体、標準品添加  Incubation bufferの添加  Hull-1 $\alpha$  Biotin conjugateの添加   
 To add unknown samples or standard To add incubation buffer To add Hull-1 $\alpha$  Biotin conjugate

静置開始日時: \_\_\_\_\_年 月 日 : \_\_\_\_\_ 静置終了時刻: \_\_\_\_\_ : \_\_\_\_\_  
 Date/time of incubation started Time of incubation done

96 ウェル割り付け記録 Sample location on 96-well plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ブランク blank	ブランク blank	注射用水-1 Distilled Water-1									
B	IL-1 $\alpha$ 3.0ng/mL	IL-1 $\alpha$ 3.0ng/mL	注射用水-2 Distilled Water-2									
C	IL-1 $\alpha$ 7.0ng/mL	IL-1 $\alpha$ 7.0ng/mL	注射用水-3 Distilled Water-3									
D	IL-1 $\alpha$ 15.0ng/mL	IL-1 $\alpha$ 15.0ng/mL										
E	IL-1 $\alpha$ 31.0ng/mL	IL-1 $\alpha$ 31.0ng/mL										
F	IL-1 $\alpha$ 62.0ng/mL	IL-1 $\alpha$ 62.0ng/mL										
G	IL-1 $\alpha$ 125.0ng/mL	IL-1 $\alpha$ 125.0ng/mL										
H	IL-1 $\alpha$ 250.0ng/mL	IL-1 $\alpha$ 250.0ng/mL										

5. HRP希釈液の添加 To add HRP diluent

HRP希釈液添加 To add HRP solution   
 静置開始時刻: \_\_\_\_\_年 月 日 : \_\_\_\_\_ 静置終了時刻: \_\_\_\_\_ : \_\_\_\_\_  
 Time of incubation started Time of incubation done

6. 基質による発色と反応停止 To add substrate and to add stop solution

反応開始時刻: \_\_\_\_\_年 月 日 : \_\_\_\_\_ 反応終了時刻: \_\_\_\_\_ : \_\_\_\_\_  
 Time of incubation started Time of incubation done

7. 吸光度測定とIL-1 $\alpha$ 産生量の計算 To analyze OD and calculation of IL-1 $\alpha$  concentration

450nmの吸光度を測定 To analyze at absorbance (450nm)

吸光度を別途配布するデータシートに転記 Raw data is input to the data sheet.

データシートをプリントアウトして裏面に貼付 The data sheet is stuck on this back of the seat.

転記ミスがないことを確認 Check of input error.

作業日時: \_\_\_\_\_年 月 日 : \_\_\_\_\_  
 Operation date

特記事項 Note

記録日: \_\_\_\_\_年 月 日 試験担当者: \_\_\_\_\_ 確認日: \_\_\_\_\_年 月 日 試験責任者: \_\_\_\_\_  
 Date Operator Check date Study director

事務局確認 確認日: \_\_\_\_\_年 月 日 氏名: \_\_\_\_\_  
 Secretariat Check date Date

## 改定履歴

版	内容	改定日
Ver. 1	1) 初版	2008年2月27日
Ver. 2	1) 誤記を修正	2008年2月28日
Ver. 3	1) 後培養時間、判定基準を Performance Standards for Applying Human Skin Models to in vitro Skin Irritation Testing の EpiSkin の方法に準拠して修正した。 2) 操作手順に、写真、図による説明を追記した。	2008年3月17日
Ver. 4	1) 作業記録シート (1~6) を追記した。 2) IL-1 $\alpha$ ELISA kit に関する説明、及び試験操作を追記した。 3) 2. 準備の項に、「LabCyte EPI-MODEL24 の配送について」、「および取扱い上の注意」を追記した。 4) 2. 準備の項に、被験物質に関する記載を追記した。 5) 2. 準備の項に、消耗品類の中で一括調達する品目を別途選別して記載した。 6) 3. 2. 5. 2 抽出液の吸光度測定の前項のデータ処理方法について、計算方法を具体的に記載した。	2008年5月15日
Ver. 4.1	1) スカルベルを 2.4 一括準備消耗品の項から、2.5 その他消耗品に移動した。 2) 試験方法から、一人で作業する場合に関する記載を削除した。 3) IL-1 $\alpha$ ELISA 調製試薬を 3.1 事前準備の項から、3.2 試験操作に移動した。 4) IL-1 $\alpha$ ELISA 操作フローチャートを追加した。 5) MTT フォルマザンの抽出について、冷暗所で静置から、冷暗所（冷蔵庫内でも可）で静置に変更した。 6) MTT 培地の調製法について、溶解方法に超音波洗浄装置やポルテックスミキサーの使用を例として追記した。 7) 作業記録シート3の被験物質情報の洗浄時刻を適用時間チェックに変更した。	2008年5月21日
Ver. 5.0	1) IL-1 $\alpha$ ELISA 調製試薬各項の番号が記入ミスのため、訂正した。 2) 作業記録シート3のSLSのロット番号記入欄を削除した。 3) 作業記録シート3のPBSのロット番号記入欄を追記した。 4) 作業記録シート5のイソプロパノールのロット番号記入欄を追記した。 5) 作業記録シート5の培養皮膚の取り出しの際のスカルベルの使用	2008年8月27日

	<p>について、チェックボックスを追記した。</p> <ol style="list-style-type: none"><li>6) 作業記録シート 6 に、IL-1<math>\alpha</math> ELISA キットのロット番号記入欄を追記した。</li><li>7) 2.2 の IL-1<math>\alpha</math> ELISA kit の製品形態が 96tset のみに変更されたのに伴い、品種コード、kit 構成について、該当箇所を変更した。</li><li>8) 3.1.2 陽性対照物質の調製量を半分の 10mL に、保存条件を 1 ヶ月から 24 時間以内に変更した。</li><li>9) 2.4 一括準備消耗品の 24 ウェルアッセイプレートと 96 ウェル測定プレートのメーカー名、型番を明記した。</li><li>10) インキュベーションや培養時間等、時間をより具体的に追記した。</li><li>11) 4. 評価基準に試験成立条件を追記した。</li><li>12) 3.2.2.2 被験物質の適用で、液体の適用法をより具体的に改めた。</li><li>13) 作業記録シートに英語表記を併記した。</li><li>14) 被験物質の適用間隔を、1 分間隔からおおよそ 1~3 分間隔に改めた。</li><li>15) 表、フローチャートに番号を入れた。</li><li>16) 作業記録シートのロット番号記入欄の大きさを変更した。</li><li>17) 日時、期日の記入欄を月日から、年月日に変更した。</li><li>18) 全ての作業記録シートの末尾に、試験責任者確認日、試験責任者氏名、及び事務局確認（確認日、氏名）の各記載欄を追記した。</li><li>19) 作業記録シート 5.6 の 96 ウェル割付記録の記載欄の大きさを変更した。</li><li>20) 作業記録シート 3.4 の被験物質名を被験物質コード番号に変更した。</li><li>21) 作業記録シート 3 を 3-1、3-2 と 2 ページ構成とし、3-1 の末尾に作業日、試験担当者、試験責任者確認日、試験責任者氏名の各記載欄を、3-2 の筆頭に施設名、試験番号、試験名の各記入欄を設けた。</li></ol>	
--	---	--

## LabCyteバリデーション研究の 記録用紙についての質疑応答

平成21年2月18日

## 記録用紙の経緯

- ・大森先生に届いた記録用紙を石山先生と小島が確認。不備について、1月末にメールで質問した。

## 丸石製薬1

- データの取り直しを実施した IL-1 $\alpha$  の作業記録シートについて  
96ウェル製り付け記録がある作業記録シート6以外は2回目の実験のものを参照と考えてよろしいでしょうか。
- 「作業記録シート7」及び「確認点検のシート等」はデータの取り直しを行いました11/25付のものを参照下さい。
- 提出された書類のデータが穴あけパンチによって欠損している部分がある。データが正しいことを確認するためにも、穴を開けていない書類をお持ちでしたらお送り頂きたく存じます。
- 再度プリントアウトしたデータをお送り致します。
- 本試験 3回目の作業記録シート5について  
MTT 割り付け記録に記入漏れがございます。データシートをチェックする際は、MOLECULAR DEVICES Template Display の MTT アッセイ3回目を確認しますが、よろしいでしょうか。
- 大変申し訳ございません。「DEVICES Template Display」の MTT アッセイ3回目のシートをご参照下さい。MTT 割り付け記録につきましては追配致しまして再度お送り致します。

## 丸石製薬2

- ELISA First と ELISA Second に入力されたデータについて  
ご提出頂いた書類では小数点3桁までのデータが記載されておりますが、データシートには小数点4桁まで入力されております。どちらが正しいデータでしょうか。また、データシートに入力されたデータが正しい場合、小数点4桁目が必ず5になる理由も併せてお答え頂きたく存じます。
- プレートリーダーよりプリントアウトしたデータ(Basic Endpoint Protocol)が正しいものです。  
弊社ではプレートリーダーのデータをコピーペースト(Excel)でデータシートに直接貼り付けておりますが、何故、この様になったか原因はわかりません。手入力したデータシートを再度お送り致します。

## ファンケル

- 御施設の吸光度生データの記録を確認できませんでした。よろしければ、郵便、FAXまたは添付ファイルでお送り頂けませんか。
- 吸光度の生データについてですが、本日、FAXで送信させていただきました後、郵送致します。
- 1回目のIL-1 $\alpha$ でNo.102の測定を2回行った理由をお教え下さい。
- 1回目のIL-1 $\alpha$ の測定についてですが、測定サンプルがDWを含め13サンプルで、4ウェルあったため同じサンプルを測定しております。102を選択した理由は特にございません。

## 残農研

- 御施設の陽性対照物質の調製記録を確認できませんでした。よろしければ、FAXまたは添付ファイルでお送り頂けませんか。
- 記録用紙の送付について、弊所の不手際でご迷惑をお掛けし申し訳ございません。ご指摘の用紙はLabCyteバリデーションDの「陽性対照調製記録」の事ではないかと存じます。実は記録用紙をお送りする際に違っていた。そうです。試験プロトコルの作業記録シートの3に「陽性対照物質の調製」があり、内容が重複することに気がついていました。ご存じのように、GLPでは一つの作業における生データは一つ、同一の内容がある場合にはいずれかを選択しなければなりません。その理由から、試験プロトコルの作業記録シートの3に発生し、こちらをお送りしようです。よく考えると、被験物質管理者の立場と実験進行の立場から2種の記録用紙ができてきたように思えますので、いずれの記録用紙もお送りすべきであると反省しております。未だに申しわけございませんでした。LabCyteバリデーションDの「陽性対照調製記録」を添付ファイルにてお送りいたします。

## 小林製薬

御施設のシート7~9を確認できませんでした。  
試薬および陽性対照の使用記録、機材・機器の点検記録です。よろしければ、郵便、FAXまたは添付ファイルでお送り頂けませんか。  
→うっかりしておりました、記録シート7~9をお送りしていませんでした。> 添付ファイルをご確認下さい。

## 愛研1

1. 実験を4回実施した理由をお知らせ下さい。それらの結果の扱い方についてもお教え下さい。  
→ 1回目の溶媒対照ODが基準外であったため、未採用
2. 大森先生に提出された資料のすべてのプリント物をお送り下さい。結果の照合ができません。  
→ 「大森先生に提出したプリント物」というのはコピーしてお送りしたもの、同じ物でよろしいでしょうか。原本でなくてよいでしょうか。また、エクセルのデータシートは送らなくてよいのでしょうか。  
同じもので結構です。  
→ エクセルのデータシートのみメール添付でお送りします。量がかなり多いのでその他の物は郵送にてお送りします

## 愛研2

3. 御施設の分光光度生データが570-650nmの引き算であることを示す記録をお送り下さい。また、このデータをExcelシートに手入力されたということでしょうか。よろしいですか？その場合のデータ確認はどなたがされていますか？  
→ プレートリーダーの570nm-650nmの計算の証拠として取説の写しを送ります。大森先生の方には作業記録とLabCytバリ記録A.B.C.Dをお送りしました。小島先生にお送りしようと思っただけの作業記録をコピーしたところ、4回目試験の18ページ目が抜けていることに気づき、大森先生に問い合わせました。小島先生の方に全部お送りしているとのことでした。小島先生のお手元にある愛研の実験した記録についての作業記録は4回目の18ページ目が抜けていないでしょうか。  
手入力のミス確認？？
4. 小野寺様はどのような立場の方で、どのような視点で何の項目を確認されたかという確認事項をお送り下さい。登録されていない方の名前が写ることは重大な問題です。  
→ ????

## 富士フィルム

- 御施設のシート7を確認できませんでした。いわゆる、機器校正・作動確認の記録です。よろしければ、郵便、FAXまたは添付ファイルでお送り頂けませんか。
- 機器等の校正は、本実験前には行っておりません。ピペット等は、バリデーション実験専用の物を使用しておりますので、「機器校正・作動確認記録」は予備試験前に記録した用紙になります。本日、FAXにて送付致しますので、宜しくお願いします。

### LabCyteバリデーションに関する 昨今の動向と今後の予定

平成21年2月18日

### OECDガイドライン

- |          |   |
|----------|---|
| 2008年10月 | OECD皮膚刺激性専門家会議→MTTのみの評価指標、GHS基準との整合性、他の培養皮膚モデルの提案 |
| 2009年1月  | LabCyteのSPSFをOECDに提案                              |
| 3月       | OECD会議で議論   |
| 6月       | OECD皮膚刺激性専門家会議開催                                  |

### OECDガイドラインへの道

2009年3月30日に予定されておりますOECD会議までに以下の条件がすべてクリアできない場合にはSPSFを取り下げる。

- 1) 今後のバリデーション結果がJ-TECの結果とかけ離れている場合
- 2) J-TECの論文が実行委員会までに投稿されていない場合
- 3) バリデーション報告書が3月30日に間に合わない場合
- 4) 4月からJaCVAM peer reviewが始まらない場合

### 問題点

1. Performance standardが最終決定されていない。
2. LabCyteのaccuracyが他のモデルよりやや低い。
3. J-TECの追加実験で基準値をクリアできるか？

### 学会発表

- |         |                                |
|---------|--------------------------------|
| 2009年3月 | SOT却下                          |
| 7月      | 日本トキシコロジー学会                    |
| 9月      | 7 <sup>th</sup> World Congress |
| 11月     | 日本動物実験代替法学会第22回大会              |

### 論文

目標 2009年6月末までにAATEXに投稿

### 3) 皮膚感作性試験代替法 LLNA-BrdU 法の第三者評価

#### 研究要旨

(財)化学物質評価研究機構から提案のあった皮膚感作性試験 Local Lymph Node Assay (LLNA) の放射性同位元素 (RI) 標識化合物を用いない代替法 (LLNA-BrdU 法) は、欧米に比較し RI の管理に厳しい本邦でも容易に実施できることから LLNA 法に比較して利点があると判断された。また、LLNA-BrdU 法は施設内再現性および施設間再現性が高く、LLNA 法との結果の対応性が高く、皮膚感作性を評価する LLNA 法の代替として有用であると判断された。

#### A. 研究目的

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 (GPMT/BT 法) の代替法として広く知られている。LLNA-BrdU 法は<sup>3</sup>H-thymidine の取り込み量の代わりに Bromodeoxyuridine を指標として判定する方法であり、ラジオアイソトープ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。本研究では、LLNA-BrdU 法の専門家による第三者評価を目的とした。

#### B. 方法

##### B-1) 評価委員

委員長\*

田中憲徳 (食品薬品安全センター 秦野研究所  
遺伝毒性部)  
大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所)

副委員長

金澤由基子 (食品薬品安全センター 秦野研究所  
毒性部) \*

委員

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部) \*

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)

手島玲子 (国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部)

萩野滋延 (株) 資生堂、品質保証センター)

牧 栄二 (財) 食品農医薬品安全性評価センター) \*

オブザーバー

笛木 修 (独) 医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部)

\*: 一次評価にも参加

##### B-2) 経緯と方法

医薬品等の皮膚感作性は主に Guinea Pig

Maximization Test 法 (GPMT 法)、Buehler Test 法 (BT 法) やその変法などで評価されてきたが、試験期間が GPMT 法で 24 日、BT 法で 38 日程度と長く、作業負荷やコストが多いため面や長時間の閉塞貼付や Freund's Complete Adjuvant の使用など動物にストレスを与えることによる動物愛護の面で問題もあり、新しい方法が求められてきた。近年、これらの点を解消する試験法として Kimber らや Basketter らによりマウスを用いる Local Lymph Node Assay (LLNA) が提案され、欧米を中心にバリデーションが行われ、広く使用されるようになった。OECD の安全性試験法ガイドラインとしても 2002 年に承認された。しかし、この方法は<sup>3</sup>H で標識された Methyl-thymidine の DNA への取り込みを指標とする方法であるため、RI の取扱い規制の厳しい日本での普及は不十分であった。RI を用いない方法としては我が国の施設で開発された Bromodeoxyuridine の取り込みをみる方法 (BrdU 法) が開発され、代替法に関する厚生労働科学研究班 (主任研究者: 大野泰雄) に新しい動物実験代替法として申請された。研究班ではこれらの方法が RI を用いないという利点以外にも簡便、かつ比較的短期間で終了する方法であることから、評価に値する方法であると考え、日本動物実験代替法学会 (代替法学会) に評価を依頼した。これを受け、代替法学会では評価委員会において、平成 17 年度より主に申請者の提出した資料に基づき一次評価を行った。その結果、これらの試験法は原法である LLNA 法とほぼ同様の原理による方法であること、ほとんど同一の識別能力を持つこと、RI を用いないこと、簡便であり、比較的短期間で結果が得られるといった利点があると判断した。しかし、行政試験法として評価する為には、更にデータの信頼性や施設間再現性についての情報を得る必要があることから、多施設バリデーションの実施を代替法学会に依頼した。代替法学会のバリデーション委員会はこの依頼を受けバリデーション実行委員会を組織し、バリデーション研究を行った。今回、LLNA-BrdU 法についての第二次バリデーションが終了し、その報告を受けたことから、評価委員会ではバリデーション研究報告書並びに関連して収集した情報に基づき、LLNA-BrdU 法が LLNA



法の代替法として妥当であるか否かを、更に評価することとした。

### C. 結果および考察

LLNA-BrdU法の施設内再現性については、第2実験の陽性対照のSI値の結果により検討した。バリデーション研究報告書によると各施設のSI値のばらつきはそれほど大きくないため、施設内再現性は良好としていた。しかしながら、施設5の陽性対照群のSI値は他の施設に比べて大きくばらついており、原因もわからなかった。評価委員会は概ね再現性は良好であるが、まれに何らかの理由で異常な値が得られることがあるので、試験実施にあたっては陽性対照のSI値に留意が必要であると考えた。

LLNA-BrdU法の施設間再現性については、第2実験での各施設、各被験物質、各濃度毎のSI値の結果により検討した。施設5の2,4-Dinitrochlorobenzene、Glutaraldehyde、Formaldehyde、Hexylcinnamic aldehyde及び施設7のLactic acidは他の施設に比べて高いSI値であった。一方、施設5と7は陽性対照物質でも他の施設に比べ高いSI値を示していた。他の施設では良い再現性が得られたことから、評価委員会は陽性対照のSI値に留意して試験を実施すれば、本法の再現性は概ね良好な結果が得られると考えた。

本バリデーションにおけるLLNA-BrdU法のLLNA法に対する感度、特異性、予測度、一致度に基づきLLNA法を代替できる可能性を考えたが、バリデーションで用いた10物質の結果と一次報告書に書かれている情報だけでは被験物質が少なく、LLNA-BrdU法による代替の可能性について結論できなかった。

資料

申請者は30物質についての自家試験結果及び第2実験に使用された化学物質の総合判定結果をまとめて評価委員会に平成20年12月19日に提出した。それによると、LLNA法で陽性と報告されている18物質のうち15物質がLLNA-BrdU法で陽性であった(感度83%)。また、LLNA法で陰性とされた12物質のうち11物質でLLNA-BrdU法で陰性であった(特異性92%)。陽性予測度は94%、陰性予測度は79%、一致度は87%であった。また、モルモットを用いた皮膚感作性試験法(GPMT/BT)やヒトでの皮膚感作性試験法(HMT/HPTA)結果と比較しても良好な対応があることが示され、LLNA-BrdU法がこれらの皮膚感作性試験法を代替できる可能性はLLNA法とほぼ同程度であると考えられた。

これらの結果から、評価委員会は、LLNA-BrdU法がLLNA法による感作性の有無の評価の代替法になり得るものと判断した。

### D. 結論

申請者の提出資料に基づく情報および代替法学会に委託したバリデーションの結果から、LLNA-BrdU法は、RIの管理に厳しい本邦でも容易に実施できることからLLNA法に比較して利点があると判断された。また、LLNA-BrdU法は施設内再現性および施設間再現性が高く、LLNA法との結果の対応性が高く、皮膚感作性の有無を評価するLLNA法の代替として有用であると判断された。

### E. 配布資料

資料3-1 第一次評価報告書

資料3-2 第二次評価報告書

(財) 化学物質評価研究機構より提案のあった  
皮膚感作性試験代替法 (LLNA-BrdU 法) の一次評価報告書 (v5)

日本動物実験代替法学会 評価委員会

委員長\*

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所)

副委員長

金澤由基子 ((財) 食品薬品安全センター 秦野研究所)

委員

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部)  
高木弘毅 (アベンティス ファーマ (株) 研究開発部門 医薬開発本部 統計解析・データ  
マネジメント部 統計解析室)  
田中憲穂 ((財) 食品薬品安全センター 秦野研究所)  
筒井尚久 (三菱ウェルファーマ (株) 創業本部 安全性研究所)  
手島玲子 (国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部)  
萩野滋延 ((株) 資生堂 安全性・分析センター 代替法開発プロジェクト室)  
牧 栄二 ((財) 食品農医薬品安全性評価センター)

オブザーバー

笛木 修 ((独) 医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部)

(所属は平成17年8月31日現在)

(財)化学物質評価研究機構より提案のあった

皮膚感作性試験代替法(LLNA-BrdU法)の一次評価報告書

要旨

平成16年度の厚生科学研究班の決定により、(財)化学物質評価研究機構から提案のあった皮膚感作性試験 Local Lymph Node Assay (LLNA)の放射性同位元素(RI)標識化合物を用いない代替法(LLNA-BrdU法)を評価した。この方法は先に評価したダイセルから提案されたATP含量の変化を指標とする方法(LLNA-DA法)と極めて類似していることから、評価委員会ではLLNA-DA法を評価するために組織した感作性試験評価ワーキンググループ(WG)で評価することとした。WGは申請者データに基づいて一次評価を行い、本試験法は原法であるLLNA法における<sup>3</sup>H-Methyl thymidineのDNAへの取り込みの代わりにBromodeoxyuridine (BrdU)取り込みを細胞増殖の指標にしたものであり、ほとんど同じ原理による方法であること、指標の増加率は若干原法より小さいが、ほとんど同一の識別能力を持つこと、RIを用いないこと、簡便であるといった利点があると判断した。しかし、行政試験法として評価する為には、更にデータの信頼性や施設間ばらつきについての情報を得る必要があることから、評価委員会からの指摘に対応し、プロトコルなどを修正した後に、多施設バリデーションを実施するよう日本動物実験代替法学会バリデーション委員会に依頼することとした。

## A. 目的および背景

医薬品などの皮膚感作性は主にモルモットを用いた Maximization test 法やその変法などで評価されてきたが、定量性に乏しいことや、免疫反応誘発の段階で動物にストレスを与えるという、動物愛護の面での問題もあり、新しい方法が求められてきた。最近、定量性のある試験法として Kimber ら (1986) や Basketter ら (1996) によりマウスを用いる Local Lymph Node Assay (LLNA) が提案され、欧米を中心にバリデーションが行われ、広く使用されるようになった。OECD の安全性試験法ガイドラインとしても 2002 年に承認された (OECD Guideline 429 Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, adopted 24th April 2002)。しかし、この方法は<sup>3H</sup>で標識されたチミジンの DNA への取り込みを指標とする方法であるため、放射性同位元素 (RI) の取扱い規制の厳しい日本での普及は不十分であった。RI を用いない方法として Bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みを検出する方法 (Takeyoshi ら 2003) や IL-2 産生を検出する方法 (Hatao ら 1995, Hariya ら 1999) が報告されていたが、未だ十分にバリデートされていなかった。一方、ダイセル化学工業 (株) の山下と出原らは ATP 含量を測定する方法を独自に開発し、代替法に関する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、かつ時間のかからない方法であり、評価するに値する方法であると考え、日本動物実験代替法学会 (代替法学会) に評価を依頼した。これを受け、代替法学会では評価委員会において、平成 16 年度より検討を行い、本試験法については適切な方法ではあるが、多施設によるバリデーションが実施されていないことから、施設間バリデーションを行うように勧告した。その結果を待って、再度評価する予定である。一方、上記の LLNA-BrdU 法も開発者の武吉により、上記厚生労働科学研究班に評価依頼が申請された。研究班では LLNA-DA 法の評価を既に行っていることもあり、慎重に検討したところ、感作誘導法が LLNA 原法と同一であり LLNA-DA 法より原法に近い試験法と考えられること、また、実際に試験を行う立場としては試験法に複数の選択肢ができるのが望ましいとの結論に達し、評価を代替法学会に依頼した。代替法学会では評価委員会で LLNA-BrdU 法も皮膚感作性試験代替法としてその妥当性について評価することとした。

## B. 評価方法

### B-1) 評価組織

評価委員会では LLNA-DA 法の評価の際に組織されたワーキンググループで引き続き LLNA-BrdU 法についても評価することとした。このワーキンググループに感作性試験の専門家、代替法評価の経験のある専門家、および統計の専門家によりワーキンググループが含まれている。また、同様にオブザーバーとして、医薬品医療機器総合機構の医薬品審査担当者の参加を求めた。以下に委員の名簿を示す。

### 評価委員会

#### 委員長

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所)

#### 副委員長

金澤由基子 ((財) 食品薬品安全センター 秦野研究所・毒性部)

#### 委員

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所・環境衛生化学部)

高木弘毅 (アベンティス ファーマ株式会社 研究開発部門 医薬開発本部 統計解析・データマネジメント部 統計解析室)

筒井尚久 (三菱ウェルファーマ 創業本部 安全性研究所)

手島玲子 (国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部)

萩野滋延 ((株) 資生堂、安全性・分析センター 代替法開発プロジェクト室)

牧 栄二 ((財) 食品農医薬品安全性評価センター)

#### オブザーバー

笹木 修 ((独) 医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部)

### B-2) 提案者

提案者は (財) 化学物質評価研究機構 日田事業所、試験研究第二課 武吉正博博士である。

### B-3) 秘密の保持と評価結果の公表について

審議結果は公開シンポジウムや研究報告書などで公開することを前提としているが、個人の経歴に関する情報は公開せず、また、委員にも配布せず、事務局で保管し、必要に応じて口頭あるいは書面提示の上で説明すべきとされた。また、今回の申請資料に掲載されたデータに基づいて今回の目的を越えて、利用、解析、公表する際には個別に申請者に了解を得なければならないとされた。なお、既に論文などに発表されたデータの利用は自由とされた。