

について SOP の記載を改めた。

提案の内、次に示すものは、今後の SOP 改訂の際に検討すべきことであり、酵母－赤血球試験の評価を行うときは、これについての検討が必要と思われる。

- (3) 用量設定試験や本試験の設定のやり方を SOP に記載すべきである。（注：1 月に対応済み。）
- (4) 溶媒選択の方法と理由について、方針を SOP に説明しておくべきである。（注：1 月に対応済み。）
- (5) 今回は被験物質を 4 倍希釈系列で実験したが、この倍率設定の妥当性を検討すべきである。
- (6) 試験の繰り返しの基準を明確にする必要がある。
- (7) 酵母光生育阻害試験では、酵母含有プレートに試薬を含ませたる紙を着装した後の UV 照射までの時間、すなわち寒天培地中への拡散のための時間の設定を SOP に記載することが望ましい。
- (8) 酵母光生育阻害試験では、照射後、試験期間終了まで、ろ紙をそのままにしておくのか、それとも除去するのか明確にすべきである。すなわち、検体の曝露時間を明確にすることが必要である。
- (9) 赤血球光溶血試験では、24 穴マイクロプレートから 96 穴マイクロプレートに移すときの割付方法を SOP に図入りで示しておくことが望ましい。
- (10) 両試験とも SOP が手順の順に書かれていないので、SOP にフローチャートを挿入しておくことが望ましい。（注：1 月に対応済み。）
- (11) 両試験とも光照射の有無による結果のみを求めているが、酵母光生育阻害試験では阻止帯の径を、赤血球光溶血試験では溶血度を測定値として記録し、用量反応を確認する判定を検討すべきである。

5-3) 判定のカットオフ値

酵母光生育阻害試験では阻止帯の径の差、赤血球光溶血試験では溶血度の差に、陽性・陰性のカットオフ値が定められている。本研究での実験結果によると、後者については SOP での値を変更する必要が感じられなかったが、前者については再検討の必要性が感じられた。

すなわち、酵母光生育阻害試験の判定基準が、以前の論文では 2mm であったものが、今回は光源の変更に伴い一致率を高めるためということで 5mm とされた。そこで今回の実験では、阻止帯の径差が 2mm 以上 5mm 未満の場合を擬陽性としたが、実験結果を見ると、阻止帯のカットオフ値を、例えば 3mm～4mm に変更することで施設間再現性が良くなる。酵母光生育阻害試験については、カットオフ値を再検討すべきであろう。

一般に試験法の結果判定では、陽性対照が明確に陽性を示すことが前提になる。それなのに本研究で、各施設から得られた陽性対照の値は、今回設定のカットオフ値 5mm 付近に密集していた。これは、カットオフ値の再検討が必要であることを示している。

なお、両試験とも光照射の有無における差に対してカットオフ値を設定し、陽性・陰性を判定しているが、酵母光育成阻害試験では阻止帯の径を、赤血球光溶血試験では溶血度を反応値として用量反応を確認し、これも判定に利用する判定方法も検討すべきであろう。

5-4) *In vivo* 判定の妥当性

表 1 の陽性・陰性等の判定において、資生堂の方はモルモットについての測定値によっているが、ECVAM 等の方は文献から結果のみを引用したものであり、その根拠となるデータは入手できなかった。被験物質 C (Chlorhexidine) の酵母－赤血球試験では、全施設で明確な陽性が見られたにもかかわらず、*in vivo* 判定が逆だったことは *in vivo* 判定の根拠の再確認の必要性を示している。

一致度は *in vivo* 判定を基準にしているので、*in vivo* 判定で擬陽性を考えないで、一致度を評価するときは、実験判定での擬陽性をどちらかに含めるべきであろう。感度と一致度で 2 種類の指標を検討したのはそのためである。

5-5) バッテリーの役割

二つの試験を総合して判定する規則は表3に示したように、陽性>擬陽性>陰性の順で強い判定の方を採用することになっている。この規則では、先に試験をすることになっている酵母光生育阻害試験で陽性であれば、もう1つの試験はする必要がないが、本研究では、相互関係を確かめることもあって、全ての場合について両方の試験を行うことにした。

結果として、赤血球光溶血試験が必要でなかったかどうかを調べると、表8が得られる。表中で()で囲んであるのが不要だった実験で、太字で示したものが酵母光生育阻害試験の結果を総合判定で変更させた実験である。36実験中14実験で、バッテリーでの判定が酵母光生育阻害試験単独と変わっている。両者の組み合わせであることが大きな意味を持っていると言える。

表8 二つの試験の役割 (P: 陽性, G: 擬陽性, N: 陰性)

物質	施設	酵母	赤血球	総合	物質	施設	酵母	赤血球	総合	物質	施設	酵母	赤血球	総合
A	a	P	(E)	P	B	a	P	(N)	P	C	a	E	P	P
	b	E	E	E		b	N	N	N		b	N	P	P
	c	E	N	E		c	P	(N)	P		c	N	P	P
	d	E	P	P		d	E	N	E		d	N	P	P
D	a	P	(P)	P	E	a	P	(P)	P	F	a	N	N	N
	b	N	E	E		b	E	P	P		b	N	P	P
	e	E	N	E		e	E	P	P		e	N	N	N
	f	N	P	P		f	E	P	P		f	N	N	N
E	c	P	(P)	P	H	c	N	N	N	I	c	N	N	N
	d	E	P	P		d	E	N	E		d	N	N	N
	e	E	P	P		e	E	N	E		e	N	N	N
	f	E	P	P		f	E	N	E		f	N	N	N

5-6) 吸光度の測定波長

本研究では、吸光度の測定波長を540nmにすることを標準にしたが、同時に525nm前後の波長でも測定を行った。両者の結果を比較すると、表9が得られる。わずかではあるが、525nm前後で判定の方が感度、一致度の両面で良い結果を与えている。評価の際には、どちらの波長を標準にするかの判断が必要と思われる。

表9 *In vivo* 判定との類似性の吸光度測定波長による違い

左: 赤血球光溶血試験での吸光度を540nmで評価, 右: 525nmで評価 (単位は%)

感度 I: 陽性物質を陽性と判定した割合, 感度 II: 陽性物質を陽性または擬陽性と判定した割合, 特異度: 陰性物質を陰性と判定した割合, 一致度: 判定結果が *in vivo* の結果と一致した割合

	施設コード						平均
	a	b	c	d	e	F	
感度 I	100	0	67	67	50	100	63.9
感度 II	100	67	100	100	100	100	94.4
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致度	67	0	67	50	50	67	50.0
一致度 II	67	33	83	67	67	67	64.0

	施設コード						平均
	a	b	c	d	e	f	
感度 I	100	67	67	67	100	100	83.3
感度 II	100	67	100	100	100	100	94.4
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致度	67	33	67	50	67	67	58.3
一致度 II	67	33	83	67	83	67	77.8

5-7) SOP 逸脱例

赤血球光溶血試験で SOP から次のような逸脱が生じたので、その取り扱いを大森、小島、吉村で検討し、以下に示す対処を行った。

(1) 24穴プレートから96穴プレートに分ける際に、実施が2系列でなされなかった。

=> 分けるのは測定のためなので、このデータを本研究のデータとして採用した。

(2) 予備試験と本試験 1 回目の陽性対照に、自施設で購入したものをを用いたので訂正のために実験を 2 回追加した。

=> 2 回目と 3 回目の測定値を採用した。

(3) 被験物質の濃度設定を誤ったので、新たに 2 実験を行った。

=> 追加した 2 実験のデータを採用した。

(4) 1 回目と 2 回目が大きく食い違ったので、実験を 2 回追加した。

=> 3 回目までのデータを採用した。

5-8) 将来のバリデーション研究における留意点

実験参加者から、将来のバリデーション研究で留意すべきこととして、以下の指摘が出された。

(1) 酵母光生育阻害試験では、判定に個人差がどれくらい影響するかを検討すべきである。

(2) 光毒性試験の施設間変動を調べるバリデーション研究の場合、実験装置のみでなく、実験室の広さや採光・遮光の条件を事前に明確にしておくべきである。

(3) 光毒性については、今回の使用したものと異なる光源を用いた場合に結果がどのように変わるか検討すべきである。

(4) 今回の研究では、SOP で光源とフィルターを指定したが、試験法を一般化するときは光源を特定の機器にするのではなく、機器の性能で指定する方が望ましい。その条件を検討すべきである。

(5) 今回は、施設 b で実験施設上の問題が生じ、研究結果の解釈にあいまいさを残した。また、陽性対照が確かに陽性反応を示さなかったり、GLP 遵守が不十分であったりした例も現れた。今後のバリデーション研究では、技術研修の後で試用試験を行い、実験設備・試薬・技術・SOP の妥当性を再確認し、改善・対処を行うべきである。

(6) 結果論であるが、被験物質 C の *in vivo* 判定の妥当性が本研究の大きな焦点となった。今後の研究では、事前に *in vivo* 判定の根拠を調べ、それが十分でない物質は被験物質に含めないことが必要である。

6. 本研究のまとめ

6-1) 酵母－赤血球試験の妥当性

本研究の結果が表 6-1 にまとめられたとすると、感度 II が 100%、特異度が 47%、というのが一応の実験結果である。擬陽性を陽性とすれば、陽性物質を誤って陰性といわないという意味で、酵母－赤血球試験の有用性が示されたことになる。

6-2) 施設間差

実験条件に問題があった施設 b を除けば、施設間の違いは陽性と擬陽性、擬陽性と陰性の範囲に収まっていた。

6-3) カットオフ値

赤血球光溶血試験のカットオフ値については特に目立った問題は見られなかったが、酵母光生育阻害試験のカットオフ値には再検討の余地が見出された。これを適切に定めることによって感度を高めることができるかもしれない。

6-4) 吸光度の測定波長

実験結果によれば、540nm より 525nm 前後の波長帯を用いるの方が良かったので、SOP でも波長を 525nm に変更することを検討すべきである。

6-5) 判定方法の改善

2 回の実験の再現性吟味と、酵母－赤血球試験での総合判定には用量反応関係を利用する方が良いと思われる。特に非照射下での結果に用量反応関係がある場合は慎重な判定を行うべきである。

6-6) GLP 遵守

かなり大幅なデータクリーニングが必要であった。GLP 遵守を徹底すべきである。

別添え資料

1. 合同委員会議事録
2. 「光毒性試験代替法バリデーション研究試験計画書」(添付資料一式)
3. 「データ解析報告書」(一式)

光毒性試験代替法バリデーション研究 補完実験報告書

2006年12月28日

酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会
委員長 吉村 功

1. はじめに

日本動物実験代替法学会（以下「本学会」）バリデーション委員会（以下「バリデーション委員会」）は、本学会会長より、2006年6月16日に「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリー（以下「酵母-赤血球試験」）のための酵母光生育阻害試験（以下「酵母試験」）について、改訂 SOP の妥当性検証のためのバリデーション研究を行うことを依頼された（資料(2)参照）。

これは2004年に報告された酵母光-赤血球試験のバリデーション研究（以下「前研究」）の結果に対して、本学会評価委員会（以下「評価委員会」）が SOP に不備があることを指摘してその改訂を求め、結果として2006年6月にその改訂が行われたためである。

バリデーション委員会は、依頼に応じるため、「酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会」（以下、「実行委」、資料(7)参照）を組織し、研究（以下「本研究」）を委託した。実行委員は、板垣宏、石川牧恵、石川公平、大森崇、岡本裕子、川端留美、小島肇、田中憲穂、土肥孝彰、長谷川靖、穂谷昌利、吉村功（委員長）の12人である。

実行委は、「光毒性試験代替法補完実験計画書」（以下「計画書」、資料(6)参照）に基づいて2006年7月4日の打合会を出発点として、石川牧恵、今井教安、米澤理一郎、松永康明、若栗忍の6人を実験担当者として、組織的な研究を開始した。

実行委は、計画書にそって、強度計の校正、被験物質の選択、試料・機材の配布を行い、実験担当者は改訂 SOP に従って、予備実験と本実験を9月末までに行った。データ解析担当者は、実験担当者から送られたデータを吟味・確認した上で解析を行い、データ解析報告書 ver1.1 を作成した。実行委は、2006年10月30日に中間報告会を開催して内容を検討し、データ解析報告書と SOP の改訂について意見をまとめた。

本報告書は、中間報告会后に補足されたことを含めて、研究全体の内容をまとめたものである。

2. 研究課題

本研究の目的は、今回の SOP 改訂が、酵母-赤血球試験における施設内変動、施設間変動を縮小するという側面、in vivo の結果の予測という側面で有用であるかを、実験を通して吟味することである。

3. 研究の遂行

研究は概ね計画書にそって遂行された。

3-1) 実験の方針

酵母-赤血球試験は2つの試験を併せて光毒性を評価する試験であるから、本来なら補完実験も前研究と同様な規模で行うべきであった。しかしながら (1) 今回の改訂は酵母試験に限定されていた、(2) 前回の規模で実験を行うことは実験施設の負担が大きすぎて実行不可能であった、という2つの理由から、実行委は、本研究での実験を酵母試験のみで行うことにした。そのため、実験参加施設、被験物質共に前研究の赤血球光溶血試験（以下「赤血球試験」）のデータが存在するものに限定せざるを得なかった。すなわち、赤血球試験に関しては前研究のデータを用いることとなった。

3-2) 実験施設

実験を行った施設は、前研究に参加した 6 施設のうち、前実験の施設代表委員が当該施設を退職した 1 施設を除く、以下の 5 施設である。（括弧内は実験担当者）

(株)コーセー研究本部品質保証センター（今井教安）
 (株)資生堂安全性・分析センター（石川牧恵）
 (財)食品薬品安全センター秦野研究所（若栗忍）
 日本メナード化粧品（株）総合研究所（松永康明）
 マルホ（株）京都 R&D センター（米澤理一郎）

3-3) 被験物質とその割り当て

実験の方針上の制約から、被験物質とその割り当ては前研究と同じものであり、その内容は表 1 の通りである。試料送付におけるコードは、予測可能性を小さくするように前研究と異なるものとした。

表 1 各施設で実験を行った物質（○印）

被験物質名	コード	in vivo 判定	施設コード				
			a	c	D	e	f
アントラセン	A	P	○	○	○	×	×
アミオダロン	B	P	○	○	○	×	×
クロルヘキシジン	C	N	○	○	○	×	×
クロルプロマジン	D	P	○	×	×	○	○
ピチオノール	E	N	○	×	×	○	○
S L S	F	N	○	×	×	○	○
アクリジン	G	P	×	○	○	○	○
6-メチルクマリン	H	N	×	○	○	○	○
Parsol 1789	I	N	×	○	○	○	○

3-4) 光源と強度計の校正

太陽光のシミュレーション光源はすべての施設で Dr. Hönle 社の SOL500 にした。光の強度計の校正を 2006 年 7 月 10 日に行ったところ、標準としている強度計と大きく異なった値を示すものが 2 台あったので、この 2 台の施設には、標準としている強度計を送って自施設の実験の際に再度校正を行って換算係数を定め、実験を行うこととした。その換算係数はデータとして報告されている。

3-5) 吸光度の測定波長と実験条件の記録

前研究と全く同じとした。（資料(9)参照）

4. 結果の要約

実験で得られたデータは、計画書に従ってデータ解析担当者に送られ、解析された。

その詳細は「データ解析報告書 ver1.2」（資料(5)参照）の通りである。以下の説明はこの報告書を要約したものであるから、細部を確かめたいときはこれを参照していただきたい。

4-1) 施設内再現性

本研究では、施設内データ量が少ないので施設内再現性を評価するのが困難である。その難点を緩和するために、酵母-赤血球試験としては平均値を用いるべき繰り返しの測定値を、個別の測

定値として扱って施設内再現性の評価に利用した。また、酵母-赤血球試験では使わないことになっている測定値も施設内再現性の評価に用いた。そのデータは表2の通りである。

この特殊な取り扱いによる判定での（陽性、擬陽性、陰性）を平均値での判定によるものと区別するために、この報告では、前者を（+、+/-、-）と表記し、後者を（P、G、N）と表記することにした。

この表記を用いると、陽性対照については2回の判定がすべての施設で(++)であり、9被験物質については表3の場合に施設内で判定の違いが生じていた。この結果は前研究より施設内再現性の良いものであるから、SOPの改訂によって施設内再現性は改善されたと考えられる。

改訂SOPでの酵母試験の用量反応曲線は、ほとんどの施設で1回目と2回目と同じ傾向であったが、そうでない施設も散見された。SOP改訂によっても施設内ばらつきは多少残っていると考えられる。

表2 施設内再現性評価に利用したデータ

	被験物質コード	試験法	実験回数	施設内再現性	施設間再現性	理由	
施設コード	e	D	酵母	1	○	×	・用量の設定を間違えて、後に追加の2試験が提出されているため施設間再現性の評価から除外。
		D	酵母	2	○	×	
	f	F	酵母	2	○	×	・予備試験および本試験1回目の結果とあわず光毒性陽性となったが、原因は不明。やり直しのため、3回目を実施。よって2回目の結果は施設間再現性の評価からは除外。
	a	D	赤血球	1	○	×	・用量の設定を間違えて、後に追加の2試験が提出されているため施設間再現性の評価から除外。
		D	赤血球	2	○	×	
	c	H	赤血球	4	○	×	・計画書には4回目を実施するようには記載されていない。
	e	D	赤血球	1	○	×	・1回目はその施設で購入した陽性対照物質を用いて実験が実施されており、後に2試験を実施しているため施設間再現性の評価からは除外。(実質的には指標の計算に陽性対照は使われていない)
		E	赤血球	1	○	×	
		F	赤血球	1	○	×	
		G	赤血球	1	○	×	
		H	赤血球	1	○	×	
I	赤血球	1	○	×			

表3 施設内で異なる結果が出た場合

	施設	被験物質	可能性
	c	H	+/- or +
	d	B	+/- or +
	f	F	+/- or +

4-2) 施設間再現性および *in vivo* 判定との類似性

表4は施設間再現性の検討結果を要約したものである。採用している指標は次の通りである。

感度 I：陽性物質を陽性と判定した割合

感度 II：陽性物質を陽性または擬陽性と判定した割合

特異度：陰性物質を陰性と判定した割合

一致度： *In vivo* 判定と判定が一致した割合

注：感度 I と感度 II の値が同じだったので、特異度については両者を区別しなかった。

表4 施設間再現性 (P:陽性, E:擬陽性, N:陰性)

被験物質	コード	In vivo 判定	施設				
			A	c	d	e	F
アントラセン	A	P	P	P	P		
アミオダロン	B	P	P	P	P		
クロルヘキシジン	C	N	P	P	P		
クロルプロマジン	D	P	P			P	P
ピチオノール	E	N	P			P	P
SLS	F	N	N			N	G
アクリジン	G	P		P	P	P	P
6-メチルクマリン	H	N		G	N	P	P
Parsol 1789	I	N		N	N	N	N

表5 In vivo 判定に対する実験判定の類似性 (540nm)

	施設コード					平均
	a	c	d	e	f	
感度 I	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	103/13 (100%)
感度 II	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	13/13 (100%)
特異度	1/3 (33%)	1/3 (33%)	2/3 (67%)	2/4 (50%)	1/4 (25%)	8/17 (42%)
一致度	4/6 (67%)	4/6 (67%)	5/6 (83%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	18/30 (60%)

すべての施設 (3 または 4 施設) で判定が陽性となった陰性物質は 1 物質 (物質 C, クロルヘキシジン) のみで, 前研究の 2 物質と比較して減少した。物質 C は, 本研究で実施された酵母光生育阻害試験でも用量反応関係がほぼ見られなかったため, 陽性判定は赤血球光溶血試験のためである。

5. 考察

5-1) SOP 改訂の陽性対照に関する影響

SOP 改訂は, 陽性対照を確実に陽性対照と判定することに焦点を合わせて行われた。その結果, すべての施設で陽性対照が陽性判定となった。改訂の妥当性が確認できたと考えられる。しかしこのことは, 阻止帯の長さをより長い方に伸ばすことになったため, 阻止帯の差のばらつきを大きくする傾向を生み出し, 結果として施設間で大きなばらつきを生じさせたと考えられる。

5-2) 被験物資による SOP 改訂の影響の違い

物質 A (アントラセン) や物質 B (アミオダロン) などの陽性物質では施設間差がみられたが, 陰性と判定された物質には, 大きな施設間差がみられなかった。SOP 改訂が, 陽性判定をより明確に出そうとしたものであったため, 阻止帯の差のばらつきを大きくしたと考えられる。

5-3) 阻止円の測り方

中間報告会の討論において, 実験担当者から阻止円の測り方について疑問が出た。プレートの底まで円が貫通しているものと表面だけに円が見られるものがあったためである。報告会の後で試験法の提案者で検討を行ってもらい, 表面だけでもよいという結論が提出された。その結果として, SOP の該当部分に測定法の改訂が行われた。(資料(8)4.18 参照)

5-4) 酵母試験での施設間差

物質 E (ピチオノール), 物質 F (SLS), 物質 H (6-メチルクマリン) は施設によって酵母試験の判定が異なったが, 阻止帯の差の値に極端に大きな違いはなかった。改訂 SOP の下でも, 酵

母試験は、これら3物質で得られた程度の施設間差がある試験法と考えられる。

6. まとめ

最後に、補完実験の研究で得られた結果をまとめておく。

6-1) SOP改訂により、陽性対照の判定はすべての施設で陽性判定となった。この面ではSOP改訂の妥当性であったと考えられる。

6-2) バッテリーシステムでの判定は、感度Ⅰ、感度Ⅱともに100%であった。SOP改訂によって、前研究では擬陽性領域にあった物質に陽性判定が下されたためである。それにもかかわらず特異度も改善されたから、SOP改訂は有用であったと考えられる。

6-3) 陽性物質の阻止帯の差の施設間差はやや大きくなった。SOP改訂の一つの結果と考えられる。

6-4) すべての施設(3または4施設)で、バッテリーシステムでの判定とIn vivoの結果が一致したのは9物質中4物質で、前研究の2物質より多かった。これもSOP改訂の結果である。

6-5) すべての施設(3または4施設)で判定が陽性となった陰性物質は1物質(物質C、クロルヘキシジン)のみで、前研究の2物質と比較して減少した。これもSOP改訂の結果である。

2) 皮膚感作性試験 LLNA-BrdU法のバリデーション

研究要旨

昨年、皮膚感作性試験LLNA-BrdU法の多施設バリデーションが日本動物実験代替法学会 学会バリデーション委員会の下部組織であるバリデーション実行委員会にて実施された。このバリデーションの結果、12 被験物質で得られた結果から、LLNA-BrdU法は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。そこで、本年はプロトコルを改良して第2次バリデーションを実施した。その結果、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ことが明らかになった。

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 (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を実施した。その結果、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、本年はプロトコルを改訂し、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。

B. 研究方法

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。

C. 結果と考察

改訂プロトコル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プロトコルの改良を確認できたといえる (詳細は資料1-2参照)。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。

D. 結論

本研究で得られた結果から、最終的な成立条件において、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。

E. 資料

- 資料 2-1 LLNA-BrdU バリデーション研究二次報告書
- 資料 2-2 LLNA-BrdU バリデーション一次報告書

LLNA-BrdU 法バリデーション研究 (第 2 実験)

報告書

報告書作成日：2008 年6月9日

改訂日：2008年7月24日

改訂日：2008年8月6日

改定日：2009年1月17日

報告書作成責任者：小島 肇

LLNA-BrdU 法バリデーション研究実行委員会

委員長

小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部)

委員

大森 崇 (京都大学大学院医学研究科医療統計学分野)

寒水孝司 (大阪大学臨床医工学融合研究教育センター)

吉村 功 (東京理科大学工学部経営工学科)

出原賢治 (ダイセル化学工業株式会社 評価・解析センター)

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部)

金澤由基子 (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)

武吉正博 (財団法人 化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所研究第一部)

青儀 巧 (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)

田中正志 (明治製菓株式会社 医薬開発部門 動態安全性研究所)

有馬和範 (大正製薬株式会社 安全性研究所)

湯浅敦子 (富士フイルム株式会社 CSR 推進部 環境・品質マネジメント部素材試験センター)

牧 栄二 (財団法人食品農医薬品安全性評価センター)

略号の原語または意味

ACD: Allergic contact dermatitis

A00: Acetone/Olive oil

BrdU: Bromodeoxyuridine

BT: Buehler test

EC3: The estimated concentration that yields a stimulation index of three

FCA: Freund' s complete adjuvant

GLP: Good laboratory practice

GPMT: Guinea pig maximization test

HCA: Hexyl cinnamic aldehyde

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods

LLNA: Local lymph node assay

OECD: Organization for Economic Cooperation and Development

PBS: Phosphate buffered saline

RI: Radioactive isotope

SI: Stimulation index

SOP: Standard operating procedure

目次

はじめに.....	5
要約.....	5
1. 背景および目的.....	6
1.1 皮膚感作性.....	6
1.2 モルモットを用いた試験法.....	6
1.3 LLNA 法.....	6
1.4 LLNA-BrdU 法.....	6
1.5 本研究にいたるまでの過程.....	6
1.6 本研究の目的.....	7
2. 方法.....	8
2.1 組織と役割.....	8
2.1.1 研究の組織	
2.1.2 各組織の役割	
2.2 LLNA-BrdU の操作法.....	8
2.3 操作法の普及と改良.....	9
2.3.1 技術研修会	
2.3.2 予備試験	
2.3.3 第1次バリ実験によって生じたプロトコールの問題点	
2.4 被験物質および溶媒.....	10
2.4.1 割付	
2.4.2 試料等の配布	
2.5 実験実施のスケジュール.....	12
2.6 データの管理.....	12
2.7 データ解析の方法.....	13
2.7.1 体重, リンパ節重量, ATP 発光量	
2.7.2 SI 値とその95%信頼区間の算出	
2.7.3 SI値に基づく判定	
2.7.4 施設内再現性, 施設間再現性の評価	
2.7.5 代替可能性の検討	
3. 結果.....	14
3.1 選択された被験物質と割付け結果.....	14
3.2 研究の質について.....	14
3.3 データの取り扱いについて.....	14
3.3.1 析出, 沈殿等について	
3.3.2 採用基準の遵守と解析データセット	
3.3.3 解析の方針	
3.4 背景基礎データ.....	17
3.4.1 体重	
3.4.2 リンパ節重量	

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、産業で使用される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（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, 明治製薬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
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: 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.

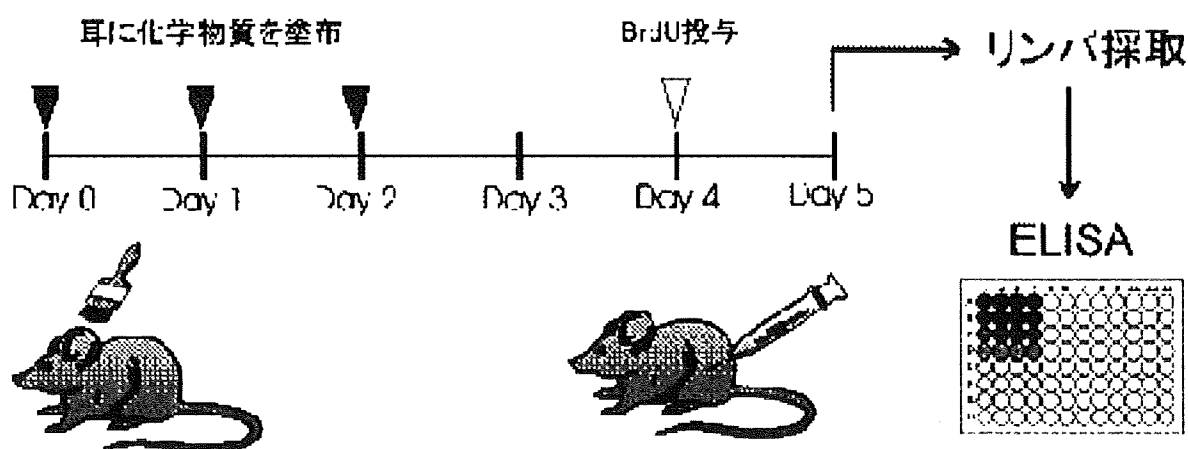


図1. LLNA-BrdU操作法

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められていたので、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デ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