

物質を標準被験物質とし全実験施設に、その他の被験物質については、物質の感作性の程度と用いる溶媒のバランスを考慮して3施設に割り付けた。

2.4.2 試料等の配布

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

表1. LLNA-BrdU法バリデーション研究の被験物質リスト

Code	No.	Substance name	Solvent	Classifi- -cation※	Dose (%)			Manufacture	Purity (%)	Lot.
B	1	Isopropanol (2-Propanol)	A00	Negative	10	25	50	Wako Pure Chemical Industries, Ltd	99.9	ASF8123
H	2	Hexylcinnamic aldehyde (Hexylcinnamal, α -Hexylcinnamaldehyde)	A00	Moderate	10	25	50	Wako Pure Chemical Industries, Ltd	97	LAQ5834
E	3	2,4-Dinitrochlorobenzene (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene)	A00	Extreme	0.1	0.3	1	Wako Pure Chemical Industries, Ltd	99	EW5685
G	4	Methyl salicylate	A00	Negative	10	25	50	Wako Pure Chemical Industries, Ltd	98	EW6518
A	5	Nickel sulfate (Nickel(II) sulfate hexahydrate)	DMSO	False Negative	1	3	10	Wako Pure Chemical Industries, Ltd	99-102	SDN0275
D	6	trans-Cinnamic aldehyde	A00	Moderate	1	3	10	Kanto Chemical Industries, Ltd		709W2149
C	7	Eugenol	A00	Weak	10	25	50	Wako Pure Chemical Industries, Ltd	95	TSK3738
F	8	Glutaraldehyde solution (ab. 25%)	ACE	Extreme	0.1	0.3	1	Wako Pure Chemical Industries, Ltd	25	EWG0243
J	9	Formaldehyde solution (36~ 38%)	ACE	Strong	1	3	10	Wako Pure Chemical Industries, Ltd	36-38	EW7698
I	10	L-Lactic acid	DMSO	Negative	10	25	50	Wako Pure Chemical Industries, Ltd	85-92	PKJ7904

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

表2. 被験物質の割付方針の概念図

	参加施設A	参加施設B	参加施設C	...
標準被験物質 1	○	○	○	○
標準被験物質 2	○	○	○	○
標準被験物質3	○	○	○	○
被験物質4	○			
被験物質5	○	○		
被験物質6	○	○	○	
被験物質7		○	○	○
被験物質8			○	○
...				...

2.5 実験実施のスケジュール

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

2.6 データの管理

2.6.1 記録用紙

記録用紙各実験施設は実験の記録・結果をSOPにもとづき作成された所定の記録用紙（資料7「LLNA-BrdUバリデーション研究記録用紙」）に記録した。

実験担当者は、以下の記録・結果を所定の記録用紙に記録する。

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

2.6.2 データシート

データ解析担当者は、データ解析のために、個々の動物より得られる測定結果（体重，リンパ節重量，BrdU量）を入力するデータシート（資料8「データシート」）を作成した。各実験施設には被験物質のコードが記載されたデータシートのファイルが送付され、実験担当者は実験の測定結果を入力した。データ解析はここに入力されたデータに基づいて実施されている。

2.6.3 データクリーニング

データ解析担当者は、収集したデータシートに必要となるデータが入力されていなかったり、入力された値やコメントに疑義が生じた場合には、該当施設の実験担当者に連絡をとり内容を確認し、必要に応じて適切な値を入力したデータファイルの再提出を求めた。

2.6.4 データベース

データ解析担当者は、データクリーニングが終わった個々のデータシートからデータを読み込むプログラムおよびデータベースを作成した。本報告の結果はこのデータベースのデータに基づいている。

2.7 データ解析の方法

2.7.1 体重, リンパ節重量, BrdU取り込み量

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

2.7.2 SI値とその95%信頼区間の算出

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

2.7.3 SI値に基づく判定

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

2.7.4 施設内再現性, 施設間再現性の評価

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

2.7.5 代替可能性の検討

代替可能性の指標として, GPMT法もしくはBT法による判定(Guinea-pig maximization testおよびBuehler test, 以下, GPMT/BT法), LLNA法のそれぞれの方法に対する感度, 特異度, 一致割合, 陽性予測度, 陰性予測度を算出した。本研究はバリデーション研究であるため, 同一物質の同一濃度での実験を複数の施設で実施している。このため, 同一物質の判定は, 個々の濃度について算出されたSI値の重み付平均が濃度依存的に正の傾きでSI値が2を超えた場合を陽性, そうでない場合を陰性とする判定に基づいた。

以上の解析には, SAS version 9を用いた。

3. 結果

3.1 選択された被験物質と割付け結果

表3に各施設への被験物質の割付け結果を示す。基本的には1施設あたり6被験物質を実施した。すべての被験物質が3施設以上の施設で実験するようにした。

表3. 割り付けられた被験物質とその実験順序

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

3.2 研究の質について

研究の質を確保するために、以下を実施した。

- ・ 記録用紙のチェック

すべての記録用紙を確認し、不備については後日問い合わせで確認した。

- ・ データクリーニング

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

- ・ 技術移転および予備試験の実施

- ・ 計画書、SOP の改訂経過の記録

3.3 データの取り扱いについて

3.3.1 析出、沈殿等について

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

3.3.2 採用基準の遵守と解析データセット

前述したように第2次バリ実験では、

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

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

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

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

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

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

なお、希釈・再実験の実施状況は添付資料とした。

表 4. 陽性対照物質のデータ採否

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

データ採否 (1) : 吸光度 0.1~0.2, 希釈・再実験データの使用

データ採否 (2) : 吸光度の制限なし, 希釈・再実験データの使用なし

○ : 採用, △ : 非実施による不採用, × : 適合外による不採用

表5. 被験物質のデータ採否

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

* LLNA 法の評価結果に基づく感作性の判定

データ採否(1)：吸光度 0.1~0.2, 希釈・再実験データの使用

データ採否(2)：吸光度の制限なし, 希釈・再実験データの使用なし

○：採用, △：非実施による不採用, ×：適合外による不採用

表6. データ採否の内訳

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

△, ×は不採用として計数

3.3.3 解析の方針

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

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

表7. 解析対象データ

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

3.4 背景基礎データ

3.4.1 体重

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

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

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

表 8. 1 日目および 6 日目の体重の基本統計量

17JUL2008:17:36:16

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

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

17JUL2008:17:36:16

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

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

3.4.2 リンパ節重量

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

表9. リンパ節重量の基本統計量

17JUL2008:17:36:16

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

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

3.4.3 BrdU取り込み量 (吸光度)

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

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

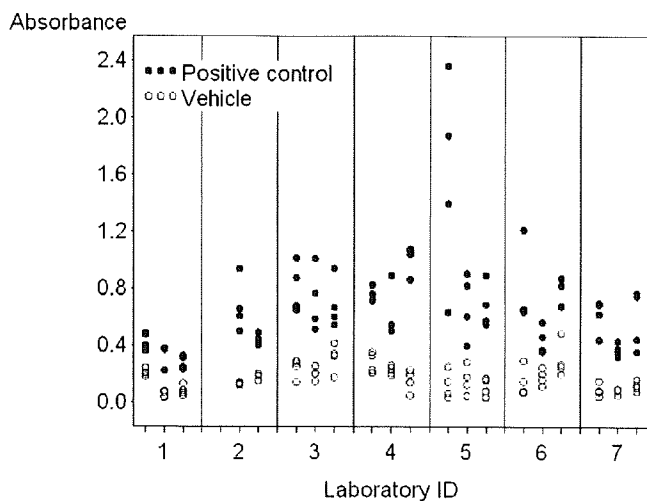


図3. 各施設のBrdU取り込み量（吸光度の分布）

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

17JUL2008:17:36:17

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

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

表11. 溶媒吸光度の群内平均の基本統計量

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

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

25JUL2008:16:32:31

Mean absorbance and SI value (SI_sub_A.txt)

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

25JUL2008:16:32:31

Mean absorbance and SI value (SI_sub_B.txt)

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

25JUL2008:16:32:31

Mean absorbance and SI value (SI_sub_C.txt)

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

25JUL2008:16:32:31

Mean absorbance and SI value (SI_sub_D.txt)

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

25JUL2008:16:32:31

Mean absorbance and SI value (SI_sub_E.txt)

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

25JUL2008:16:32:31

Mean absorbance and SI value (SI_sub_F.txt)

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

25JUL2008:16:32:31

Mean absorbance and SI value (SI_sub_G.txt)

Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	SI	95%CI lower	95%CI upper
G	1	Low	4	0.302	0.431	1.43	1.16	1.75
	1	Mid	4	0.302	0.417	1.38	0.96	1.98
	1	High	4	0.302	0.381	1.26	1.03	1.54
	2	Low	4	0.173	0.192	1.11	0.80	1.55
	2	Mid	4	0.173	0.201	1.16	0.83	1.62
	2	High	4	0.173	0.248	1.44	1.02	2.04
	3	Low	4	0.220	0.242	1.10	0.73	1.67
	3	Mid	4	0.220	0.267	1.21	0.75	1.96
	3	High	4	0.220	0.309	1.40	0.89	2.21

25JUL2008:16:32:31

Mean absorbance and SI value (SI_sub_H.txt)

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

25JUL2008:16:32:31

Mean absorbance and SI value (SI_sub_I.txt)

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

Mean absorbance and SI value (SI_sub_J.txt)

Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	SI	95%CI lower	95%CI upper
J	1	Low	4	0.107	0.330	3.08	1.84	5.15
	1	Mid	4	0.107	0.471	4.40	2.92	6.62
	1	High	4	0.107	0.191	1.78	1.22	2.61
	5	Low	4	0.053	0.225	4.25	1.48	12.22
	5	Mid	4	0.053	0.088	1.67	0.75	3.72
	5	High	4	0.053	0.883	16.64	5.67	48.78
	6	Low	4	0.163	0.261	1.60	1.09	2.34
	6	Mid	4	0.163	0.293	1.80	1.30	2.49
	6	High	4	0.163	0.321	1.97	1.37	2.84

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4に示す各実験の陽性対照物質のSI値とその95%信頼区間を示す。

施設2の第1期でSI値が2未満となった。このため、この施設2の第1期の被験物質群（物質Bおよび物質H）のデータは不採用とし、以後の解析に含めていない。

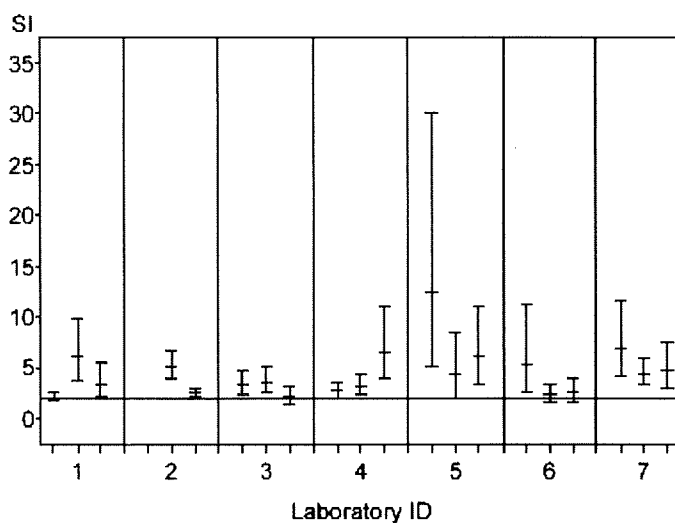
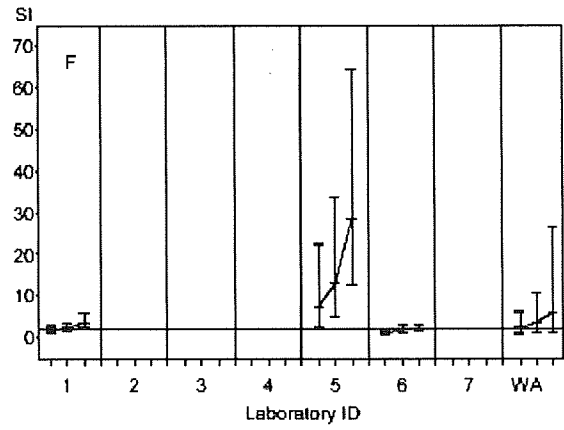
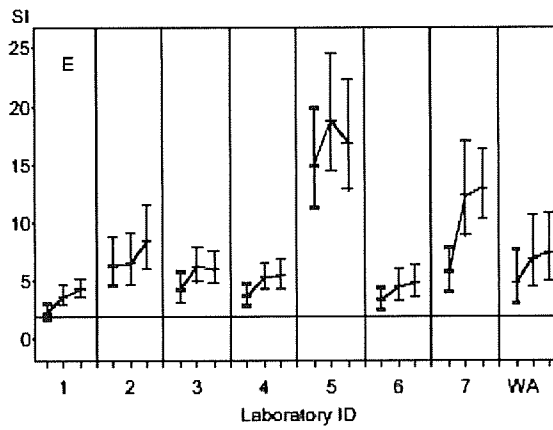
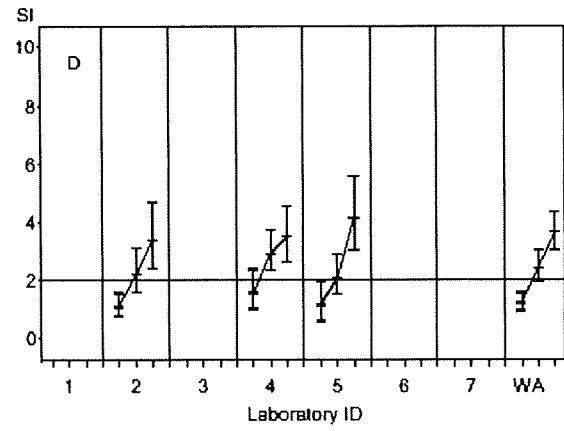
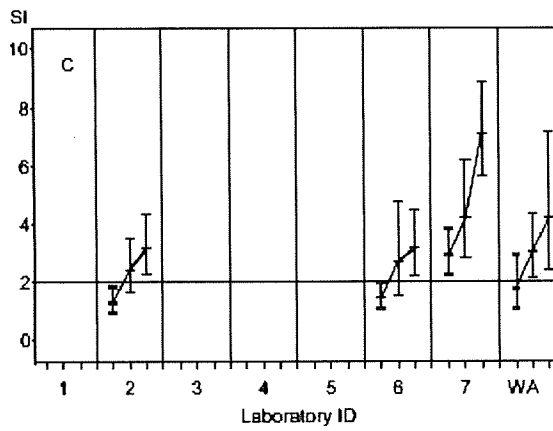
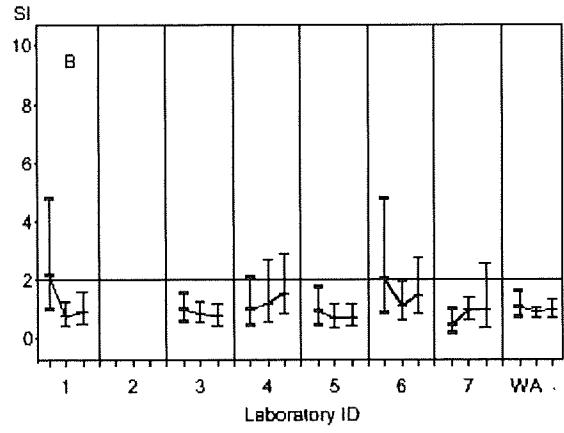
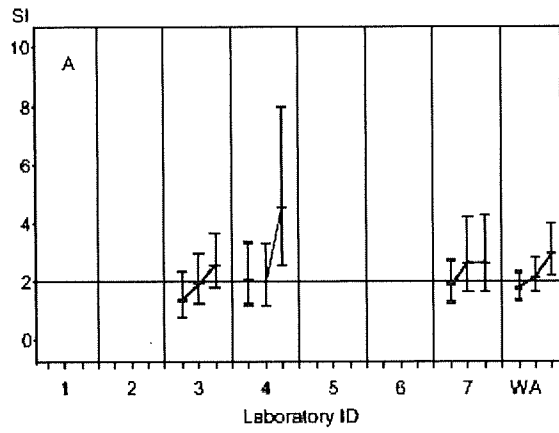


図4. 第2次バリ実験のSI値

3.6 各被験物質の用量反応関係

図5にSI値の用量反応関係を示す。図中WAと示されているのは、変量効果モデルを用いたメタ・アナリシスにより得られたSI値の重み付き平均を示している。



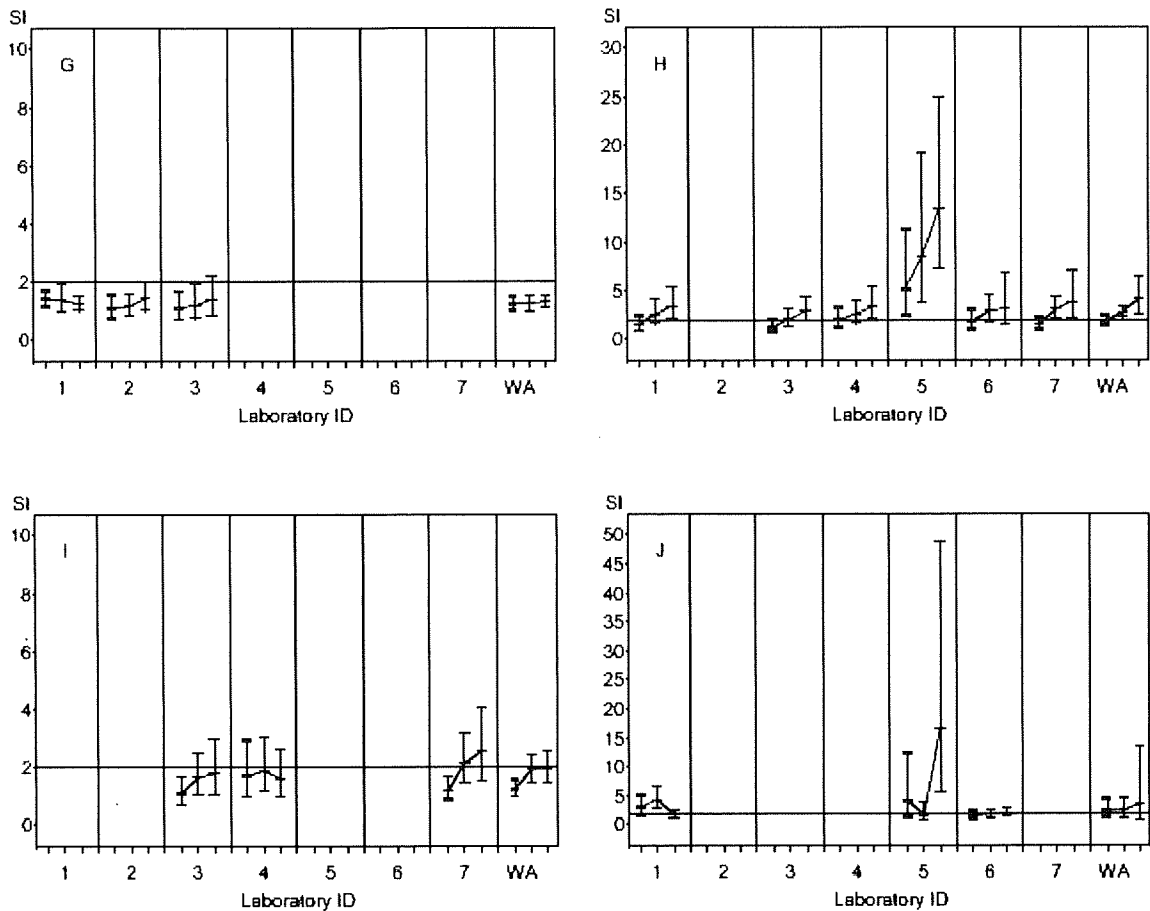


図5. 物質毎に各施設のSI値

3.7 施設内再現性

図4から陽性対照物質に関する各施設内の再現性を把握できる。図中に示された信頼区間を考慮すると、SI値のばらつきはそれほど大きくはないため、施設内再現性は良好であると判断した。また、この陽性対照物質はHCAの50%濃度であり、これは物質Hの最高濃度と同じものである（図5）。図4と図5（Hの最高濃度）に示されるSI値からも施設内の再現性は高いといえる。

3.8 施設間再現性

表13にSI値が濃度依存的に正の傾きでSI値が2を超えるものを陽性、そうでないものを陰性と判定した場合の結果を示した。施設間で判定の結果が食い違うのは物質I：lactic acidと物質J：formaldehydeであるが、図5からは施設間差は大きくないと考える。図5からは、LLNAで陰性と判定されている物質B：isopropanol、物質G：methyl salicylate、物質I：lactic acidの施設間再現性は極めて高い。物質E：2,4-dinitrochlorobenzene、物質F：glutaraldehyde、物質H：hexylcinnamic aldehyde、物質J：formaldehydeの施設5のSI値が他の施設に比べて、高い値を取っていた。施設5と7は陽性対照物質でも他の施設に比べ、高いSI値を報告している。これらの結果と信頼区間の幅を考慮すると、施設間差は受け入れられると考える。

I：lactic acidにおいて施設7が、J：formaldehydeにおいて施設6が他の施設と異なった判定結果を示した。I：lactic acidは図5に示されるように、SI値の施設感差は大きくない。J：formaldehydeの施設7は、高濃度でのSI値は大きい用量依存性が明確ではない。溶媒対照の吸光度が低く、被験物質の吸光度が高めの値を示したことが高濃度で高いSI値を示した原因のようである。

表13. 陽性・陰性の判定結果

Code	Substance name	LLNA classification	Lab No.							
			1	2	3	4	5	6	7	
A	Nickel sulfate	False Negative			P	P				P
B	Isopropanol	Negative	N		N	N	N	N	N	N
C	Eugenol	Weak		P					P	P
D	Cinnamic aldehyde	Moderate		P		P	P			
E	2, 4-Dinitrochlorobenzene	Extreme	P	P	P	P	P	P	P	P
F	Glutaraldehyde	Extreme	P				P	P		
G	Methyl salicylate	Negative	N	N	N					
H	Hexylcinnamic aldehyde	Moderate	P		P	P	P	P	P	P
I	Lactic acid	Negative			N	N				P
J	Formaldehyde	Strong	P				P	N		

P:陽性, N:陰性

3.9 代替可能性

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)の文献の値を用いた。

図5に示される重み付平均に基づき, 代替可能性を検討した結果を表14, 表15に示す。LLNA-BrdU法とGPMT/BT法の比較では, 食い違いはなく(表14), LLNA-BrdU法とLLNA法の比較ではLLNA法では偽陰性を示すと報告されているA: nickel sulfateが食い違う結果となった(表15)。判定の食い違った物質A: nickel sulfateは, LLNA-BrdU法では3施設すべてで陽性と判定されており, いずれの施設の結果も用量反応関係は明確であった。表16には以上の結果を指標の一覧としてまとめた。いずれの指標でも代替可能性は高かった。

表14. LLNA-BrdU法とGPMT/BA法の比較表

		LLNA-BrdU法		合計
		+	-	
GPMT/BT法	+	7	0	7
	-	0	3	3
合計		7	3	10

表15. LLNA-BrdU法とLLNA法

		LLNA-BrdU法		合計
		+	-	
LLNA法	+	6	0	6
	-	1	3	4
合計		7	3	10

表16. 代替可能性の指標

	n	感度	特異度	一致度	陽性予測度	陰性予測度
LLNA-BrdU 法 vs GPMT/BT 法	10	100%	100%	100%	100%	100%
		(7/7)	(3/3)	(10/10)	(7/7)	(3/3)
LLNA-BrdU 法 vs LLNA 法	10	100%	75%	90%	87.5%	100%
		(6/6)	(3/4)	(9/10)	(6/7)	(3/3)

4. 考察

4.1 本研究の位置付け

OECD (2005) のガイドライン文書34 の用語集には、キャッチアップ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、上記のキャッチアップバリデーション研究に該当すると考えた。

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法はの原理は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している。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られる。

また、LLNA-BrdU法の実験そのものはLLNA法に近く、被験物質の投与に関する変更は行われていない。

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10被験物質を選択した。LLNA法による文献のEC3値に基づき感作性を3段階[無(negative), 弱(weak, moderate), 強(strong, extreme)]に分類した場合、10被験物質の感作性の内訳は、無が3物質、弱が3物質、強が4物質であり、試験物質の選択は妥当と考えた。第1次バリ実験では、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が、第2次バリ実験では秤量したものを送付した。変更の理由として、被験物質の安定性確保、第1次バリ実験で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できなかったという短所を解決するためである。用事調製に変更したことより、実験者による状態確認と溶液もしくは均一な懸濁液の調製が可能になった。ただし、以前から長所と言われていた以下の要件も満たされた。①各被験物質の同一濃度での結果を比較する、③適用濃度から感作性の強度を予測できないようにする、④溶媒の選択。また、LLNA-DA法バリデーション研究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。

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。第1次バリ実験の経験を経て、第2次バリ実験の結果を採用したので十分な経験を持つ施設での実験になったと考えられる。

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。

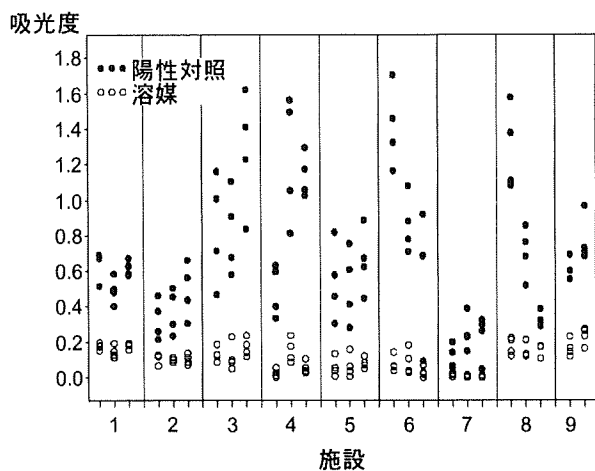
測定値がこの研究のために準備された一定の書式のデータシート(資料8)に正しく記録されているかどうかを確認するために、データクリーニングが行われ、実験中にデータシートのプリントアウトに入力されたデータと入力されたファイルとの値の整合性が確認された。なお、このデータシートは入力規制機能を用いて、不適切な値が入らないように設計された。なお、各施設から集められたデータシートの電子ファイルは、プログラムにより一括して読み込まれ、データベースが作成されている。

4.2.5 本研究の判定基準の変更について

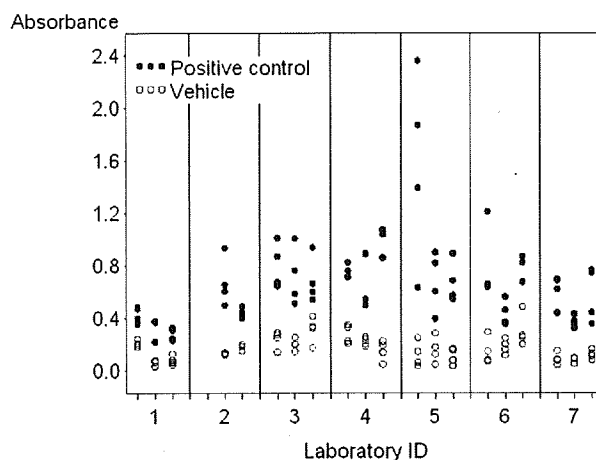
本研究で用いた SOP では、各試験施設において実施された予備実験の結果に基づき、陰性対照ウエルの吸光度が 0.1~0.2 となる細胞浮遊液を調製し実験した。そして、溶媒の BrdU 取り込み量の吸光度の平均値が 0.1~0.2 の範囲に含まれない場合には細胞浮遊液の冷蔵保存液を翌日以降希釈し、再測定するとなっていた。

しかし、希釈をしたとしても溶媒の BrdU 取り込み量の吸光度の平均値を 0.1~0.2 の範囲内に納めることは難しく、実際にこの基準を満たせない実験が多かった。この検討を実施した施設が第1次バリ実験の経験を経た施設であった点を考慮すると、この基準は厳しすぎると考えられる。また、この希釈による再測定が LLNA-BrdU 法の特徴であるが、再測定の結果としてバラツキが大きくなることが懸念された。このため、実行委は、当初設定した基準を採用するのは適切ではないと判断した。そこで、本報告では、希釈前の1回目の吸光度を用い、再測定のデータは用いないという方針に変更した。

この変更が適切かどうかについて、陽性対照物質を用いた結果で第1バリ実験(小島ら, 2007)と比較した。図6は陽性対象物質の溶媒および陽性対照物質の BrdU 取り込み量の吸光度を、図7はそこから計算される SI 値とその95%信頼区間を第1次バリ実験と第2次バリ実験で比較したものである(縦軸のスケールが異なるので注意)。図6(a)から、第1次バリ実験では溶媒の吸光度が施設毎で大きく異なっているのがわかる。特に、第1実験の施設7のように溶媒の吸光度の平均値が0に近くなると、相対的に SI 値が大きくなってしまふ(図7(a))。溶媒の BrdU 取り込み量の吸光度の平均値を 0.1~0.2 の範囲に納めることを目指して実施された第2次バリ実験では、結果的に溶媒における BrdU 取り込み量の吸光度の平均値は 0.05~0.32 の間であった。この場合、図7の(b)からわかるように、SI 値が極端に大きくなる傾向はみられない。よって、溶媒における BrdU 取り込み量の吸光度をある程度の範囲に管理することで、安定した結果が得られると考えられる。

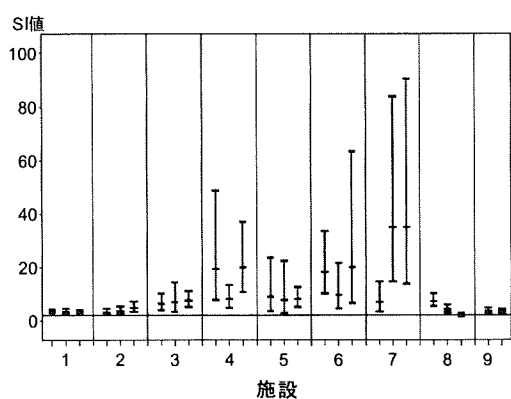


(a) 第1次バリ実験

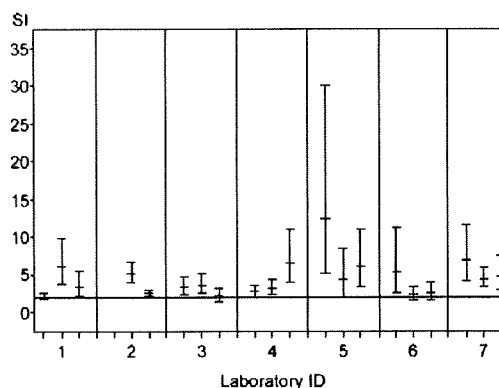


(b) 第2次バリ実験

図6. 第1次バリ実験および第2次バリ実験における陽性対照物質のBrdU取り込み量（吸光度の分布）



(a) 第1次バリ実験



(b) 第2次バリ実験

図7. 第1次バリ実験および第2次バリ実験における陽性対照物質のSI値

SOP では、最終容量 15mL の細胞浮遊液を作成する例が記載されており、複数の施設でこの例に従って実験が行われていた。実験間のばらつきを小さくするために、細胞浮遊液の作成方法は統一した方がよいと考える。この試験法を実施するには、最終容量 15mL 前後で事前に至適条件を検討し、吸光度が 0.1~0.2 に入るようにリンパ節の細胞浮遊液の作製条件を求めることが望ましいと考える。

以上の観点から、現時点における LLNA-BrdU 第 2 バリ実行委の推奨する実験条件は以下のとおりである。

- (1) 事前に溶媒の BrdU 取込み量の平均吸光度を 0.1~0.2 前後にするための至適条件を検討し、細胞浮遊液の最終容量を決める。
- (2) 細胞浮遊液の希釈は行わない。
- (3) 陽性対照物質 HCA50%濃度における SI 値が 2 以上を結果の採用する。

ただし、実験結果を解釈する際、溶媒の平均吸光度があまりに小さい場合には、SI 値が極端に大きくなる場合があることに注意する。

なお、誤解がないように注記しておくが、最終的に推奨する SOP に記載した実験の成立基準に関しては、データ解析上緩和した基準であり、エンドポイントである BrdU の取込み量や陽性の判断基準を変更しているわけではない。エンドポイントと判定基準は研究の計画に規定された事項に基づき解析を実施している。