

添付資料 3

LLNA-DA 法バリデーション研究報告書

LLNA-DA 法バリデーション研究（第 1 実験）

報告書

Version 2.1

報告書作成日：2007 年 6 月 27 日

報告書作成責任者： 大森 崇

LLNA-DA 法バリデーション研究実行委員

委員長

大森 崇（京都大学大学院医学研究科医療統計学分野）

委員

小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所薬理部）

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）

小坂忠司（財団法人 残留農薬研究所 毒性部）

浦谷 衛（石原産業株式会社 中央研究所 安全科学研究室 安全性グループ）

山中 淳（ピアス株式会社 中央研究所 ARI 評価グループ）

篠田伸介（株式会社 薬物安全性試験センター埼玉研究所 第二毒性部）

中村洋介（住友化学株式会社 情報電子化学業務室）

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）

米田知史（トーアエイヨー株式会社 研究開発部 福島研究所）

花田智彦（日本新薬株式会社 創薬研究所 安全性研究部）

猪田健人（中野製薬株式会社 マーケティング本部研究）

田中正志（明治製薬株式会社 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）

宇佐美雅仁（ホーユー株式会社 総合研究所 基盤技術研究室）

篠田直樹（参天製薬株式会社奈良研究開発センター）

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

略号	原語	意味
ACD	Allergic Contact Dermatitis	
AOO	Acetone/Olive Oil	
ATP	Adenosine triphosphate	
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	
SLS	Sodium Lauryl Sulfate	
SOP	Standard Operating Procedure	

目次	
はじめに	6
要約	7
1. 背景	8
1.1 皮膚感作性	8
1.2 モルモットを用いた試験法	8
1.3 LLNA 法	8
1.4 LLNA-DA 法	9
1.5 本研究にいたるまでの過程	9
1.6 本研究の目的	9
2. 方法	10
2.1 組織と役割	10
2.2 LLNA-DA の操作方法	11
2.3 技術研修会	12
2.4 ルミノメータの校正	12
2.5 予備実験	12
2.6 被験物質	13
2.7 割付	13
2.8 試料等の配布	14
2.9 実験実施のスケジュール	14
2.10 データの管理	14
2.11 データベース	15
2.12 データ解析の方法	15
2.12.1 体重, リンパ節重量, ATP 発光量	15
2.12.2 SI 値とその 95%信頼区間の算出	15
2.12.3 施設内再現性、施設間再現性を評価する方法	15
2.12.4 代替可能性の検討の方法	16
2.12.5 EC3 の算出方法と刺激のカテゴリー	16
2.12.6 ソフトウェア	16
3. 結果	17
3.1 研究の質について	17
3.2 選択された被験物質と割付け結果	17
3.3 データの取り扱いについて	20
3.4 背景基礎データ	23
3.4.1 体重	23
3.4.2 ATP 発光量	24

3.4.3 リンパ節重量と ATP 発光量の関係	28
3.5 LLNA-DA の分析感度	30
3.6 各被験物質の用量反応関係	31
3.7 施設間の再現性	36
3.8 施設内の再現性	38
3.9 代替可能性	39
3.9.1 感度, 特異度, 一致割合	39
3.9.2 EC3	41
4. 考察	42
4.1 本研究の位置づけと意義	42
4.2 本研究で評価した LLNA-DA 法の操作上の特徴	43
4.3 本研究の妥当性	43
4.3.1 被験物質の選択	43
4.3.2 データの質に関して	43
4.3.3 施設内再現性	44
4.3.4 施設間再現性	44
4.3.5 比較対照とした対象となる試験法のデータの妥当性	45
4.3.6 対象となる試験法のデータとの対応性	45
4.3.7 個々の被験物質に対する考察	45
4.4 本研究の限界と今後の課題	47
5. 結論	48
謝辞	49
参考文献	50

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・DA 法バリデーション研究実行委員会が実施したバリデーション研究 (第 1 実験) の報告書の第 2 版である。

本報告書の第 1 版にあたる Version 1.0 は、被験物質を明らかになる前に作成されたため、被験物質に関する事項はすべて割り振られたコードのみで記載された。その後、被験物質が明らかになったため、被験物質コードとともに被験物質名を記し、被験物質が明らかになったことによる考察を追加した。さらに Version 1.0 では記載していなかった個々の施設の SI 値と、施設ごとの判定結果を追記した。また、Version 1.0 に記載していた「研究外の妥当性」、「評価委員による評価結果への返答としてのまとめ」、「SOP について」という項目を別に記すことにして、本報告書から削除した。

この Version 2.1 では、当初作成された Version 2.0 についてバリデーション委員会から得たいくつかの意見を反映させた。大きな変更点は、被験物質の調整日と投与日に関する記述の追記である。

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 (GPMT/BT 法) の代替法として広く知られている。LLNA-DA 法は³H-thymidine の取り込み量の代わりに ATP 量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、施設間再現性と代替可能性の検討を主目的とした LLNA-DA 法の新施設バリデーション研究を実施した。

【方法】 本研究は LLNA-DA 法の実験プロトコールに基づいて実施した。12 の被験物質のうち、3 物質は全 10 施設で、残りの 9 物質は 3 施設ごとに評価した。各被験物質をコード化し、3 用量に調製して各実験施設に送付した。溶媒対照群の ATP 発光量に対する被験物質群の ATP 発光量の比 (stimulation index, SI 値) が 3 を超えた場合、陽性と判定した。

【結果と考察】 全施設で評価した 3 被験物質及び 3 施設で評価したその他の 5 被験物質については、施設間のばらつきは小さく、すべての施設の判定が一致した。施設間で判定が一致しなかった 4 物質中 2 物質には明らかな用量反応関係がみられたが、残りの 2 物質 (cobalt chloride と nickel sulfate) はばらつきが大きかった。この原因にはこれら被験物質の溶媒や被験物質の物性が影響している可能性があるかと推察された。GPMT/BT 法に対する LLNA-DA 法の感度、特異度、一致割合はそれぞれ 87.5% (7/8), 100% (3/3), 90.9% (10/11) であり、この結果は同じ被験物質の文献値で算出した GPMT/BT 法に対する LLNA-DA 法の感度、特異度、一致割合と同程度であった。

【結論】 本研究で実施した 12 の被験物質の濃度範囲で得られた結果は LLNA 法と同程度であり、キャッチアップバリデーション研究として受け入れられるものであると思われる。

1. 背景

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 リンパ球による反応である IV 型アレルギーにより接触部位に一致して炎症反応をきたしたものをいう。ACD は産業で使用す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関連があることが知られている。このため、化学物質の感作性を評価することは、安全性評価において重要であると認識されている。

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では、長い間モルモットを用いた試験である Guinea-pig maximization test 法 (GPMT 法) や Buehler test 法 (BT 法) により実施されてきた (OECD (1992))。これらの試験法では、感作誘導を行い、一定期間後の惹起処置による皮膚反応を観察することによって感作性を評価する。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することにより感作誘導を行うが、BT 法では FCA を用いない。

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 (例えば 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)。

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、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-DA 法

ダイセル化学工業（株）は、リンパ細胞増殖を検出する指標を ^3H -thymidine の代わりに adenosine triphosphate (ATP) 含量に改良した LLNA-DA 法を開発した (Yamashita ら (2005))。また、LLNA-DA 法では LLNA 法と同等の検出感度を得るため投与回数の変更がなされている。この試験法の SOP を資料 4 「LLNA-DA 法プロトコール」に示す。

1.5 本研究にいたるまでの過程

ダイセル化学工業（株）は、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）に評価を依頼するため LLNA-DA 法を新しい動物実験代替法として応募した。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-DA 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の支援により、バリデーション研究を実施することとなった。これが本報告書で報告するバリデーション研究である。

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

本研究の目的は、LLNA-DA 法を被験物質名遮蔽下で実施したときに、

- 1) 複数の施設間でどの程度一致するか（施設間再現性）、
 - 2) 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）
- を、多施設での実験を通して評価することである。

なお、2)の目的に対しては、GPMT/BT 法に対する LLNA-DA 法の代替可能性が、GPMT/BT 法に対する LLNA 法の代替可能性とどの程度一致するのかについて検討することを含めた。

2. 方法

本研究の研究計画は、研究実施前に定められた研究計画書（別添 1）に従い実施された。

2.1 組織と役割

・研究の組織

本研究を遂行するための研究組織、LLNA・DA 法バリデーション研究実行委員会（以下、LLNA・DA 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組織した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。

当初、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会が参加施設を公募したところ、19 の実験施設がバリデーション研究の参加を希望した。しかしながら、一度にこれだけの施設に動物および測定器の供給を行うことが不可能であったために、実験施設を選択せざるを得なかった。そこで、LLNA 法やそれに準じた試験法を実施した経験の有無、日本動物実験代替法学会の評価委員会に委員が属するか否か、6 物質の被験物質が実施できるか否か、後に実施されることになっていた LLNA 法の別の変法である LLNA・BrdU 法への参加を希望するか否か、測定機器の所持状況などが勘案され、最終的に 10 施設がこの研究の実験を実施する施設となった。しかしながら、残りの 9 施設の代表者も LLNA・DA バリ実行委として本研究に参加することになった。

LLNA・DA バリ実行委を資料 1「LLNA・DA バリ実行委」に、実験参加施設とその実験担当者を資料 2「実験担当者一覧」に示す。

・各組織の役割

LLNA・DA バリ実行委は、いくつかの担当を設けた。担当と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：技術研修の準備を行い、LLNA・DA 法の内容、standard

operating procedure (SOP), 記録用紙等の説明を行い, 実技指導を行う.

被験物質選定担当者: 資料 3「被験物質候補リスト」より, 研究に用いる物質を選定する.

被験物質割付担当者: 選定された被験物質を各施設に割り付けるための割付デザインを作成して試料等手配担当者に知らせ, 研究結果が確定・公表されるまで割付の根拠を保管する.

動物・測定機器手配担当者: 実験用動物の注文・配布, 測定機器の貸借の手配を行う.

試料等手配担当者: 割付デザインと SOP に従って試料を調製し, コード化して実験参加施設に, 関連する資材と共に送付する. 研究結果が確定・公表されるまで, 割付表とコード表を保管する.

実験参加施設代表者: 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, データ解析を行う. 中間報告会では, 解析結果をまとめて報告する.

2.2 LLNA-DA の操作方法

資料 4「LLNA-DA 法プロトコール」にもとづいて, この研究用に LLNA-DA バリ実行委が SOP を作成した. この SOP の最終版は資料 5「LLNA-DA 法実験 SOP (Version 2.0)」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(25% hexyl cinnamic aldehyde), 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: 事前に被験物質候補リスト (資料 3) に記載された溶媒を用いて, 被験物質ごとに設定された濃度に調製後, 遮蔽下で送付される.

測定指標: ルシフェリン・ルシフェラーゼ法による耳介リンパ節の ATP 含量 (ATP 発光量)

試験操作: LLNA-DA 法では 3 日間連続で 1% sodium lauryl sulfate (SLS) 処置 1 時間後に被験物質溶液あるいは懸濁液を 25 μ L ずつマウスの両耳介に塗布する. 7 日目に 4 回目の塗布を行い, その 24 時間後に両耳介リンパ節を取り出し, 個体毎に重量を測定したのち, 2 枚のスライドグラスにはさんで押しつぶす. これを 1mL の phosphate buffered saline (PBS) に懸濁させる. この懸濁液を攪拌し, 膜組織を避けて 20 μ L サンプリングし,

PBS 1.98mL 中に加える。これを 0.1mL 採取して 0.1mL の ATP 抽出試薬が入ったチューブに入れ約 20 秒間静止，発光試薬 0.1mL を添加後ルミノメータにより，表示される ATP 発光量を測定する。

結果の判定：被験物質または陽性対照の ATP 発光量と溶媒の ATP 発光量の比として定義される stimulation index (SI 値) が 3 以上の時に感作性陽性とする。

1 回に実施する被験物質数：1 回の操作で 2 被験物質を実施する。(ただし，被験物質数のバランスをとる関係で，ある 1 施設に関しては 1 回の操作で 3 被験物質を実施したという例外がある。)

2.3 技術研修会

各実験施設の実験担当者が LLNA-DA 法の原理と操作法を理解できるように技術研修会を実施した。技術研修会では，研究計画書，SOP，記録用紙，データシートの説明と実験の操作方法の実施が行われた。各施設から少なくとも一人の実験担当者が，技術研修会に参加し，技術研修を受けた。

さらに，確認用の映像資料も配布した。

2.4 ルミノメータの校正

各実験施設は，予備実験を実施する前に別添 2「ルミノメータ校正標準作業手順 Version 2.0」に従い，ATP 標準試薬を用いたルミノメータの校正を実施した。10 施設中 1 施設のみが異なるメーカーの測定器を用いており，他の施設の結果と比べ若干低めの値を示していたことから，この施設も同種の機器を用いることとした。つまり，この研究ではすべての施設で同じ種類の測定器による測定が行われた。この結果すべての施設で同様な測定結果が得られたことを実験開始前に確認した。

2.5 予備実験

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，別添 3「LLNA-DA 法標準作業手順（予備試験用）Version 1.5」に従い陽性対照のみを用いた予備実験を実施した。LLNA-DA 実行委は，予備実験の結果をもとに，SOP にしたがって実験を実施することができたか，陽性対照が陽性対照として機能しているか，施設間差がどの程度あるかを検討した。その結果，すべての施設で陽性対照物質は陽性と判断され，提案施設の背景データのばらつきと比べて極端に大きな施設感差が生じていなかったため，本実験を実施することに決めた。特に大きな問題が生じていなかったため，SOP に関して大きな変更は行わなかった。

2.6 被験物質

本研究は遮蔽下で行うこととされていたが、実験者の安全性を確保するために、被験物質の候補リストを公開し、その中から被験物質を選択することにした。被験物質の候補リストは被験物質選定担当者により作成され、研究の開始前にすべての研究者に伝えられた。被験物質の候補は、既知データが豊富で、LLNA 法の実験結果が存在するものを採用することとされた。被験物質の候補リストを資料 3「被験物質の候補リスト」に示す。

実験施設に属さない被験物質選定担当者が、皮膚感作性の程度のバランスを考慮して最終的に 12 被験物質を選択した。選択された被験物質は、LLNA の結果を参考に 3 濃度が設定された。これらの被験物質は各濃度に調製された後に遮蔽化され、対応する溶媒とともに各実験施設に送付された。

2.7 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することにした。

被験物質割付担当者は、表 2.7 に概念的に示すように、被験物質選定担当者が選択した被験候補物質のうち 3 物質を標準被験物質とし全実験施設に、その他の被験物質については、物質の感作性の程度と用いる溶媒のバランスを考慮して 3 施設に割り付けた。

表 2.7 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			○	○
...				...

2.8 試料等の配布

試料等手配担当者は、各被験物質の試料溶液を調製し、実験参加施設に配布した。

動物・機器手配担当者は、各実験施設と打ち合わせを行い、動物と測定機器の手配を行った。

2.9 実験実施のスケジュール

2006 年 2 月 20 日にダイセル化学工業株式会社（姫路）、2 月 23 日に国立医薬品食品衛生研究所（用賀）で技術研修会を実施した。

予備実験は、2006 年 2 月 27 日～3 月 22 日の間に実施した。

本実験は、2006 年 4 月 3 日～7 月 5 日の間に実施した。

別添 4「実験実施期間プラン」に動物入荷と実験実施のスケジュールを示す。

2.10 データの管理

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（別添 5「LLNA-DA バリデーション研究記録用紙」）に記録した。作成した記録用紙は、

- ・ 機器校正・動作確認記録
- ・ 試薬使用記録
- ・ 動物適用記録
- ・ 試験液使用記録
- ・ 最終実験記録

の項目からなる。

データシート

データ解析担当者は、データ解析のために、個々の動物より得られる測定結果（体重、リンパ節重量、ATP 測定量）を入力するデータシート（別添 6「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ファイルが各実験担当者に送付され、実験担当者は実験の測定結果をこのデータシートファイルに入力した。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。

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．

2.11 データベース

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

2.12 データ解析の方法

2.12.1 体重，リンパ節重量，ATP 発光量

体重（1日目と8日目），リンパ節重量，ATP 発光量は基本統計量（平均，標準偏差など）を算出した．ATP 発光量は1個体あたり2つの繰り返しによる測定値が得られるが，2つの値の平均値を解析に用いた．

2.12.2 SI 値とその95%信頼区間の算出

主なデータ解析は，被験物質または陽性対照のATP 発光量と溶媒のATP 発光量の比で算出されるSI 値に基づき実施した．SI 値は，個々の実験の各用量ごとにひとつの値が得られる．SI 値の近似的な95%信頼区間は，別添7「SI 値とその95%信頼区間の計算法」に示す方法により得た．

2.12.3 施設内再現性，施設間再現性を評価する方法

施設内再現性，施設間再現性は，対数変換を施したSI 値の分散に基づいた指標で評価することにした．個々の実験で得られるSI 値は実験内差を含んでいる．そこで，施設間再現性の指標を算出する際に，対数変換後のSI 値の実験内のばらつきを考慮した施設間分散を算出し，指数をとることで指標を算出した．本報告書ではこの指標を $\exp(\tau^2)$ と表記することにした． $\exp(\tau^2)$ の計算は，対数変換を施したSI 値について施設間差を変量効果としたメタ・アナリシスの手法に基づいている（Normand (1999)）． $\exp(\tau^2)$ の最小値は1であり，この値が1に近いことは施設間のばらつきがほとんどないことを示す．施設間差が大きくなるとこの値は大きくなる．この方法の詳細については別添8「SI 値を用いた施設間再現性，施設内再現性の指標の算出法」に示した．施設間差の評価は同一物質の同一濃度について行った．

施設内再現性については，ある施設の繰り返し測定されたSI 値が必要となる．この研究では陽性対照物質を用いてこれを行うことが可能である．施設内再現性の評価の指標も $\exp(\tau^2)$ を用いた．

2.12.4 代替可能性の検討の方法

代替可能性の指標として、GPMT 法もしくは BT 法による判定（以下、GPMT/BT 法）、LLNA 法のそれぞれの方法に対する感度、特異度、一致割合、陽性予測度、陰性予測度を算出した。

本研究はバリデーション研究であるため、同一物質の同一濃度での実験を複数の施設で行っている。同一物質、同一濃度についてただ一つの代表値を得るために、対数変換を施した SI 値の重み付き平均を求めた後、指数をとることを行った。重み付き平均は、変量効果を用いたメタ・アナリシスにより算出した（別添 8）。いずれかの濃度で重み付き平均が 3 を超えた場合に陽性、そうでない場合に陰性と判定し上記の代替可能性の指標を求めた。

2.12.5 EC3 の算出方法と刺激のカテゴリー

上記の方法で得た各濃度の SI 値の重み付き平均が 3 となる濃度の予測値を EC3 として算出した。算出法は Gerberick ら（2004）に準じ、(1)すべての濃度で SI 値が下回る場合は算出せず、(2)いずれかの 2 用量間で SI 値の重み付き平均が 3 を挟む場合には直線補間により算出、(3)すべての用量で SI 値の重み付き平均が 3 を上回る場合には、3 に近い 2 つの濃度の SI 値の重み付き平均を用いて、底が 2 の対数変換した値について直線補間して算出した。また、算出した EC3 に基づき、表 2.1 に示す感作性のカテゴリーを決め（Gerberick ら（2004））、このカテゴリーで LLNA 法と LLNA・DA 法を比べた。

表 2.1 EC3 と感作性のカテゴリー

EC3 (%)	感作性の カテゴリー
算出不可能	negative
$\geq 10 - \leq 100$	weak
$\geq 1 - < 10$	moderate
$\geq 0.1 - < 1$	strong
< 0.1	extreme

2.12.6 ソフトウェア

2.12.1 から 2.12.5 までの解析は、SAS version 9 を用いて行った。

3. 結果

3.1 研究の質について

研究の質を確保するために、以下のことを実施した。

- ・記録用紙のチェック
- ・データクリーニング
- ・技術移転の実施
- ・ルミノメータの校正のチェック
- ・計画書、SOP の改訂経過の記録

3.2 選択された被験物質と割付け結果

表 3.2.1 に各施設への被験物質の割付結果を示す。基本的には 1 施設あたり 6 被験物質を実施したが、施設 No.9 と No.10 は施設のスケジュールの関係で 4 被験物質のみを実施した。すべての被験物質が 3 施設以上の施設で実験するようにしたため、施設 1 は 7 被験物質分の実験を実施した。

表 3.2.1 被験物質の割付

被験物質	感作性*	施設No.									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A: 2,4-dinitrochlorobenzene	+	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B: hexylcinnamic aldehyde	+	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C: 3-aminophenol	+	○		○					○		
D: glutaraldehyde	+	○	○			○					
E: cobalt chloride	+				○		○		○		
F: isoeugenol	+				○	○				○	
G: formaldehyde	+	○	○			○					
H: dimethyl isophthalate	-	○		○				○			
I: isopropanol	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
J: nickel sulfate	-				○		○		○		
K: abietic acid	+		○				○	○			
L: methyl salicylate	-			○				○			○

*:LLNA法の評価結果に基づく感作性の判定

表 3.2.2 に、被験物質の調製日と送付時の物質状態および被験物質の投与日を示す。

表 3.2.2 被験物質の調製日と送付時の物質の状態および被験物質の投与日

施設	物質	調製日	送付時の物質 の状態	投与日
1	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/6/6	溶解	2006/6/14
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/4/4	溶解	2006/4/12
	C: 3-aminophenol	2006/6/6	溶解	2006/6/14
	D: glutaraldehyde	2006/5/16	溶解	2006/5/24
	G: formaldehyde	2006/5/16	溶解	2006/5/24
	H: dimethyl isophthalate	2006/6/6	溶解	2006/6/14
	I: isopropanol	2006/4/4	溶解	2006/4/12
2	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/5/9	溶解	2006/5/17
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/4/4	溶解	2006/4/12
	D: glutaraldehyde	2006/5/24	溶解	2006/5/31
	G: formaldehyde	2006/5/24	溶解	2006/5/31
	I: isopropanol	2006/4/4	溶解	2006/4/12
	K: abietic acid	2006/5/9	溶解	2006/5/17
3	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/6/8	溶解	2006/6/28
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/6/6	溶解	2006/6/14
	C: 3-aminophenol	2006/5/30	溶解	2006/6/6
	H: dimethyl isophthalate	2006/6/8	溶解	2006/6/28
	I: isopropanol	2006/6/6	溶解	2006/6/14
	L: methyl salicylate	2006/5/30	溶解	2006/6/6
4	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/5/16	溶解	2006/5/24
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/5/9	溶解	2006/5/17
	E: cobalt chloride	2006/4/11	溶解	2006/4/19
	F: isoeugenol	2006/5/16	溶解	2006/5/24
	I: isopropanol	2006/5/9	溶解	2006/5/17
	J: nickel sulfate	2006/4/11	高濃度で懸濁	2006/4/19
5	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/5/24	溶解	2006/5/31
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/5/30	溶解	2006/6/7
	D: glutaraldehyde	2006/6/6	溶解	2006/6/14
	F: isoeugenol	2006/5/24	溶解	2006/5/31
	G: formaldehyde	2006/6/6	溶解	2006/6/14
	I: isopropanol	2006/5/30	溶解	2006/6/7
6	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/5/30	溶解	2006/6/7
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/6/6	溶解	2006/6/14
	E: cobalt chloride	2006/5/24	溶解	2006/5/31
	I: isopropanol	2006/6/6	溶解	2006/6/14
	J: nickel sulfate	2006/5/24	高濃度で懸濁	2006/5/31
	K: abietic acid	2006/5/30	高濃度で懸濁	2006/6/7

表 3.2.2 被験物質の調製日と送付時の物質の状態および被験物質の投与日（つづき）

施設	物質	調製日	送付時の物質 の状態	投与日
7	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/5/9	溶解	2006/5/17
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/4/11	溶解	2006/4/19
	H: dimethyl isophthalate	2006/5/9	溶解	2006/5/17
	I: isopropanol	2006/4/11	溶解	2006/4/19
	K: abietic acid	2006/4/4	溶解	2006/4/12
	L: methyl salicylate	2006/4/4	溶解	2006/4/12
8	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/5/30	溶解	2006/6/7
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/4/11	溶解	2006/4/19
	C: 3-aminophenol	2006/5/30	溶解	2006/6/7
	E: cobalt chloride	2006/5/16	溶解	2006/5/24
	I: isopropanol	2006/4/11	溶解	2006/4/19
	J: nickel sulfate	2006/5/16	高濃度で懸濁	2006/5/24
9	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/4/11	溶解	2006/4/19
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/4/4	溶解	2006/4/12
	F: isoeugenol	2006/4/11	溶解	2006/4/19
	I: isopropanol	2006/4/4	溶解	2006/4/12
10	A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2006/5/16	溶解	2006/5/24
	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/5/24	溶解	2006/5/31
	I: isopropanol	2006/5/24	溶解	2006/5/31
	L: methyl salicylate	2006/5/16	溶解	2006/5/24

3.3 データの取り扱いについて

析出、沈殿等について

複数の被験物質に析出や沈殿がみられた。しかし、同じ被験物質でも施設により析出・沈殿がみられたり、そうでなかったりしていることが判明した。明らかな原因は不明であるが、被験物質を入れた容器がプラスチックであったため、溶媒として acetone/olive oil (AOO) を用いると容器が溶ける可能性が示唆された。被験物質の状態とその対処は施設により異なっていた（表 3.3.1）。

溶媒の誤送付について

実験実施期間中、1 施設（施設5）に溶媒を誤って送付されていたことが明らかになった。その被験物質の溶媒は AOO であったが、DMSO が送られていた。この施設に被験物質が送付される際に、他の施設にも被験物質が送られていたが、その施設のみ溶媒が誤送されたのか、他の施設に送るはずの溶媒と入れ替わっていたのかを明らかにすることはできなかった。AOO が陽性対照物質の溶媒であるため、誤送が明らかとなったその施設の被験物質の溶媒のデータに限り、同じ実験で実施された陽性対照の溶媒（AOO）のデータを被験物質の溶媒のデータとみなして解析を行った。

被験物質 E (cobalt chloride) の取り扱い

被験物質 E (cobalt chloride) を実験した施設 4 では、高濃度群で 3 回目の塗布の翌日に 4 匹中 2 匹の動物が死亡した。さらに残り 2 匹の動物も自発運動の低下が認められた。この報告を受けた時点で被験物質 E (cobalt chloride) が割り付けられた他の 2 施設（施設 6, 施設 9）は実験実施前であったため、この 2 施設については施設 4 で実施した中濃度を高濃度に、低濃度を中濃度とし、新たに低濃度が再設定された。以下、本報告では被験物質 E (cobalt chloride) については再設定された濃度について報告する。

入力時の被験物質コードの改変

データシートにはあらかじめアルファベットで示された被験物質コードが記入され各施設に配布された。しかし、データシートに記入された被験物質コードとは異なる被験物質の値が入力されるという入力ミスが複数の施設で見られた。この原因は、データシートで定義した通りに、実験担当者が被験物質を群に割り付けずに、アルファベット順に割り付けたことによる。これらの誤りは、問い合わせにより適切に修正された。

データクリーニングの結果

実験担当者は、実験中に測定した ATP 発光量などを、データシートをプリントアウトしたものに書き込み、後に電子ファイルのデータシートに入力した。データ解析担当者は、測定値を記入したプリントアウトを集め、入力された電子ファイルのデータシートの値との整合性の確認を行った。値が異なった場合、各施設への問い合わせを行ない、最終的な値を決めた。

表 3.3.1 被験物質の状態と取り扱い

物質記号	施設	問題点	処理事項
A	1	-	-
	2	-	-
	3	-	-
	4	-	-
	5	-	-
	6	-	-
	7	-	-
	8	-	-
	9	-	-
	10	-	-
B	1	-	-
	2	-	-
	3	-	-
	4	-	-
	5	-	-
	6	-	-
	7	-	-
	8	-	-
	9	-	-
	10	-	-
C	1	2層分離、白色析出	超音波処理、高濃度は白色固体の残留あり
	3	沈殿	混和適用
	8	析出	攪拌、懸濁適用
D	1	-	-
	2	-	-
	5	-	-
E	4	沈殿	混ぜながら適用
	6	結晶	超音波処理、溶解確認後適用
	8	析出	攪拌、懸濁適用
F	4	-	-
	5	-	-
	9	-	-
G	1	-	-
	2	-	-
	5	-	-
H	1	白色結晶	室温攪拌
	3	析出	投与部位で析出あり
	7	-	-
I	1	析出(膜状)	超音波処理
	2	-	-
	3	-	-
	4	-	-
	5	析出	混和適用
	6	-	-
	7	-	-
	8	-	-
	9	沈殿	十分溶解しない
	10	-	-
J	4	沈殿	混ぜながら適用
	6	結晶	超音波処理、溶解確認後適用
	8	析出	攪拌、懸濁適用
K	2	析出と粘性	超音波処理、粘性により均一適用は困難
	6	析出	超音波処理
	7	析出	混和適用
L	3	-	-
	7	-	-
	10	-	-

3.4 背景基礎データ

3.4.1 体重

実験開始1日目, 8日目の動物の体重の基本統計量をそれぞれ表3.4.1, 表3.4.2に示す.

施設によっては1日目に比べ8日目の方が体重がやや増えている傾向がみられたが, 全体として施設間の大きな変動はみられなかった.

表 3.4.1 実験開始1日目の動物の体重 (g) の基本統計量

施設	データ数	平均値	標準偏差	最小値	25%点	中央値	75%点	最大値
1	120	22.0	1.5	19.3	20.9	21.8	23.1	27.1
2	108	22.5	1.3	19.4	21.5	22.6	23.5	25.0
3	108	22.0	1.2	18.2	21.4	22.0	22.8	24.8
4	108	22.7	1.4	20.0	21.8	22.5	23.7	26.7
5	108	21.6	1.1	19.1	20.7	21.6	22.4	24.4
6	108	21.7	1.4	19.3	20.6	21.7	22.7	24.9
7	108	22.8	1.4	18.5	21.7	22.8	23.9	25.9
8	108	23.4	1.5	20.5	22.3	23.3	24.4	28.6
9	72	23.0	1.2	20.1	22.4	22.9	23.8	26.5
10	72	22.6	1.4	19.8	21.4	22.5	23.7	25.8

表 3.4.2 実験開始8日目の動物の体重 (g) の基本統計量

施設	データ数	平均値	標準偏差	最小値	25%点	中央値	75%点	最大値
1	120	22.1	1.5	19.0	20.9	22.0	23.2	26.1
2	108	23.4	1.4	20.6	22.5	23.3	24.5	26.7
3	108	23.2	1.4	19.8	22.3	23.2	24.2	26.6
4	104	23.4	1.4	20.4	22.2	23.3	24.5	27.1
5	108	23.0	1.3	20.1	21.9	23.0	23.8	25.8
6	108	22.2	1.4	19.2	21.2	22.2	23.1	25.6
7	108	23.0	1.5	17.1	21.7	23.0	24.0	26.0
8	108	23.9	1.8	20.1	22.3	24.0	25.1	29.2
9	72	23.9	1.3	20.9	23.1	23.9	24.6	27.0
10	72	23.3	1.3	20.7	22.3	23.3	24.4	26.8

3.4.2 ATP 発光量

表 3.4.3 に各物質の溶媒および用量ごとの ATP 発光量の平均と標準偏差を示す。

10 施設が実施した被験物質 A (2,4-dinitrochlorobenzene) と B (hexylcinnamic aldehyde), 3 施設が実施した被験物質 D (glutaraldehyde), E (cobalt chloride), F (isoeugenol), K (abietic acid), L (methyl salicylate) ではすべての施設で用量の増加とともに ATP 発光量が増加した。被験物質 G (formaldehyde) では 3 施設中 2 施設に、被験物質 J (nickel sulfate) では 3 施設中 1 施設でこの傾向がみられた。被験物質 H (dimethyl isophthalate) (3 施設) と I (isopropanol) (10 施設) では、全ての施設で用量反応関係が明確ではなかった。

被験物質 E (cobalt chloride) と J (nickel sulfate) については溶媒の値の施設間差が大きく、施設 4 と 6 では 2 桁の違いがみられる (この 2 物質については 1 回の実験で実施されたため、溶媒の値は同一となっている)。この 2 物質については、溶媒として DMSO が用いられたことを注記しておく。

表 3.4.3.a ATP 発光量 (被験物質 A : 2,4-dinitrochlorobenzene)

		施設											
被験物質	濃度	1				2				3			
		n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
A	AOO	4	27188	10027	4	26159	2157	4	35610	7212	4	42863	9956
	0.03%	4	77305	25181	4	60843	19746	4	80548	34265	4	127990	23651
	0.10%	4	147161	32102	4	70451	26337	4	150579	23446	4	210203	57119
	0.30%	4	325485	46981	4	241465	73709	4	354678	27371	4	365768	51573

		施設											
被験物質	濃度	6				7				8			
		n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
A	AOO	4	13910	3921	4	22465	3515	4	20576	5546	4	26842	9515
	0.03%	4	38247	10833	4	86083	21219	4	49730	22738	4	75290	20086
	0.10%	4	59302	19598	4	121021	23461	4	62571	30199	4	112282	36388
	0.30%	4	210636	46213	4	296024	33270	4	259203	105308	4	292230	5423

表 3.4.3.b ATP 発光量 (被験物質 B : hexylcinnamic aldehyde)

		施設														
		1			2			3			4			5		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
B	AOO	4	24583	5761	4	41189	17452	4	35652	12253	4	43007	8931	4	19146	6582
	5%	4	33196	6535	4	56291	5484	4	48383	14959	4	64212	6709	4	23417	6260
	10%	4	73884	14255	4	109204	15298	4	82040	12032	4	138873	51932	4	35432	14357
	25%	4	142130	29633	4	198520	40800	4	158304	26958	4	219687	29834	4	76029	5733

		施設														
		6			7			8			9			10		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
B	AOO	4	16375	3953	4	29925	6142	4	12207	4127	4	29602	8049	4	29077	2876
	5%	4	27369	8594	4	46148	14005	4	16616	4630	4	25602	11242	4	40685	14674
	10%	4	38327	9530	4	126755	35639	4	50829	8197	4	65640	27871	4	79321	10548
	25%	4	90067	27828	4	212285	50835	4	124803	34287	4	114791	13669	4	101984	21546

表 3.4.3.c ATP 発光量 (被験物質 C : 3-aminophenol)

		施設							
		1			3			8	
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値
C	AOO	4	27188	10027	4	24047	3932	4	20576
	1%	4	47591	2668	4	33875	4945	4	25167
	3%	4	63021	9400	4	42352	11487	4	40921
	10%	4	76927	15323	4	41759	8243	4	49037

表 3.4.3.d ATP 発光量 (被験物質 D : glutaraldehyde)

		施設							
		1			2			5	
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値
D	ACE	4	17947	4929	4	38044	13217	4	16439
	0.05%	4	25594	9403	4	28096	9168	4	17024
	0.15%	4	72748	20584	4	48980	8745	4	40319
	0.50%	4	89767	21798	4	129110	31985	4	42237

表 3.4.3.e ATP 発光量 (被験物質 E : cobalt chloride)

		施設							
		4			6			8	
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値
E	DMSO	4	100396	24632	4	4184	2395	4	19803
	0.30%	4	-	-	4	44002	30922	4	87562
	1.00%	4	203895	24479	4	44465	23293	4	131004
	3.00%	4	267172	52088	4	85978	24933	4	159808

表 3.4.3.f ATP 発光量 (被験物質 F : isoeugenol)

		施設								
		4			5			9		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
F	AOO	4	42866	9956	4	11899	7366	4	26842	9515
	1%	4	125838	22236	4	22896	7449	4	69253	20292
	3%	4	175277	10289	4	23619	8830	4	86593	20489
	10%	4	262118	34406	4	117098	5209	4	190392	38486

表 3.4.3.g ATP 発光量 (被験物質 G : formaldehyde)

		施設							
		1			2			5	
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値
G	ACE	4	17947	4929	4	38044	13217	4	16439
	0.5%	4	52214	10965	4	64467	11056	4	19510
	1.5%	4	51405	13007	4	115143	20638	4	30959
	5.0%	4	86934	33682	4	120966	21638	4	44219

表 3.4.3.h ATP 発光量 (被験物質 H : dimethyl isophthalate)

		施設							
		1			3			7	
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値
H	AOO	4	27188	10027	4	35610	7212	4	22466
	5%	4	36534	10199	4	35710	8126	4	28306
	10%	4	31200	10875	4	34357	8364	4	25555
	25%	4	30030	10456	4	23900	3733	4	23583

表 3.4.3.i ATP 発光量 (被験物質 I : isopropanol)

		施設											
		1			2			3			4		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
I	AOO	4	24583	5761	4	41189	17452	4	35652	12253	4	43007	8931
	10%	4	37756	12448	4	37286	9163	4	36155	7444	4	67307	12946
	25%	4	27101	2623	4	35024	4878	4	23465	7953	4	38859	7172
	50%	4	28723	3313	4	33259	7651	4	30822	4465	4	34382	6421

		施設											
		6			7			8			9		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
I	AOO	4	16375	3953	4	29925	6142	4	12207	4127	4	29602	8049
	10%	4	32233	26281	4	43446	17986	4	14797	2984	4	18791	7645
	25%	4	14762	5342	4	27285	10469	4	12387	3421	4	20627	6175
	50%	4	21360	4957	4	24776	3613	4	13551	1001	4	15039	3697

表 3.4.3.j ATP 発光量 (被験物質 J : nickel sulfate)

		施設								
		4			6			8		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
J	DMSO	4	100396	24632	4	4184	2395	4	19803	4451
	1%	4	116266	22468	4	21990	7141	4	69077	14602
	3%	4	153074	35051	4	27966	6162	4	60881	7880
	10%	4	103595	20343	4	49303	14901	4	50568	9846

表 3.4.3.k ATP 発光量 (被験物質 K : abietic acid)

		施設								
		2			6			7		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
K	AOO	4	26159	2157	4	13910	3921	4	21546	13493
	5%	4	55039	8805	4	25277	9139	4	40328	8389
	10%	4	91706	17069	4	57615	12621	4	85821	24030
	25%	4	121351	36474	4	110697	29265	4	81818	24819

表 3.4.3.l ATP 発光量 (被験物質 L : methyl salicylate)

		施設								
		3			7			10		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
L	AOO	4	24047	3932	4	21546	13493	4	53350	14893
	5%	4	25764	7330	4	23459	7751	4	33663	5192
	10%	4	26361	6381	4	38158	6803	4	41698	7559
	25%	4	37359	10622	4	29881	11569	4	44426	13600

表 3.4.3.m ATP 発光量 (陽性対照 : hexylcinnamic aldehyde)

		施設														
		1			2			3			4			5		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
陽性対照	AOO	12	23639	5906	12	30284	11576	12	25429	5894	12	44371	9224	12	15183	5554
	25%	12	147032	30059	12	153995	35670	12	144091	18550	12	243877	42495	12	72877	19820

		施設														
		6			7			8			9			10		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
陽性対照	AOO	12	10447	4413	12	25112	8035	12	18428	4503	8	26327	5484	8	22309	6393
	25%	12	84748	16459	12	136327	26932	12	101382	22894	8	140388	23895	8	113209	18835

3.4.3 リンパ節重量と ATP 発光量の関係

リンパ節重量と ATP 発光量の関係を図 3.4.1 に示す。リンパ節重量と ATP 発光量の間に直線的な関係があることがわかる。ATP 発光量は時間の経過とともに減少するので、操作時間を概ね一定にしなければ適切な値を得ることができない。被験物質の影響が強いほどリンパ節重量は増加するので、ATP 発光量とリンパ節重量の間に直線的な関係がみられることは、各施設とも操作時間が厳密に遵守され、適切な操作で行われたことを示している。

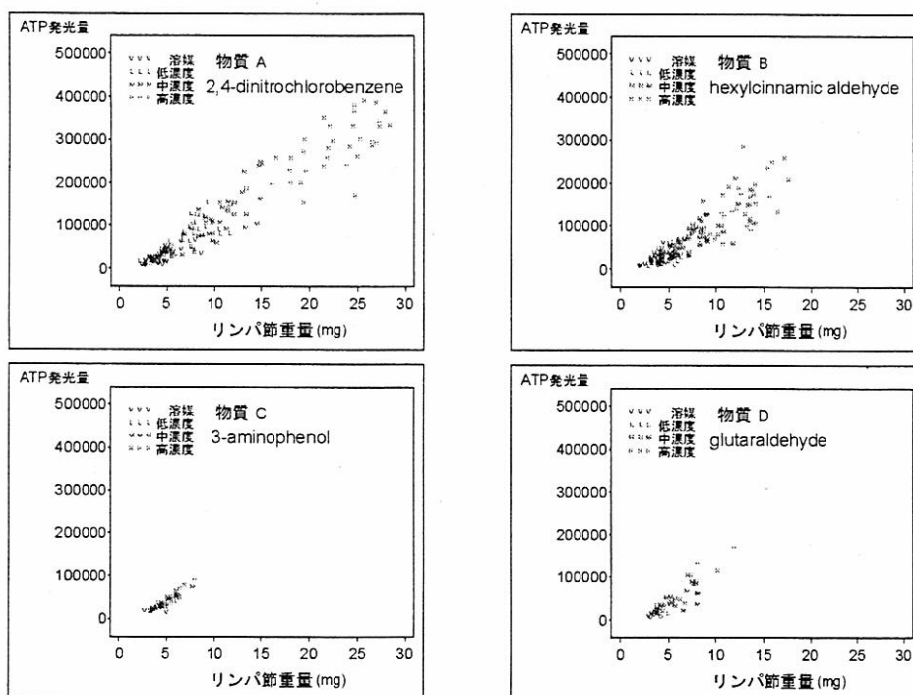


図 3.4.1 リンパ節重量と ATP 発光量の関係

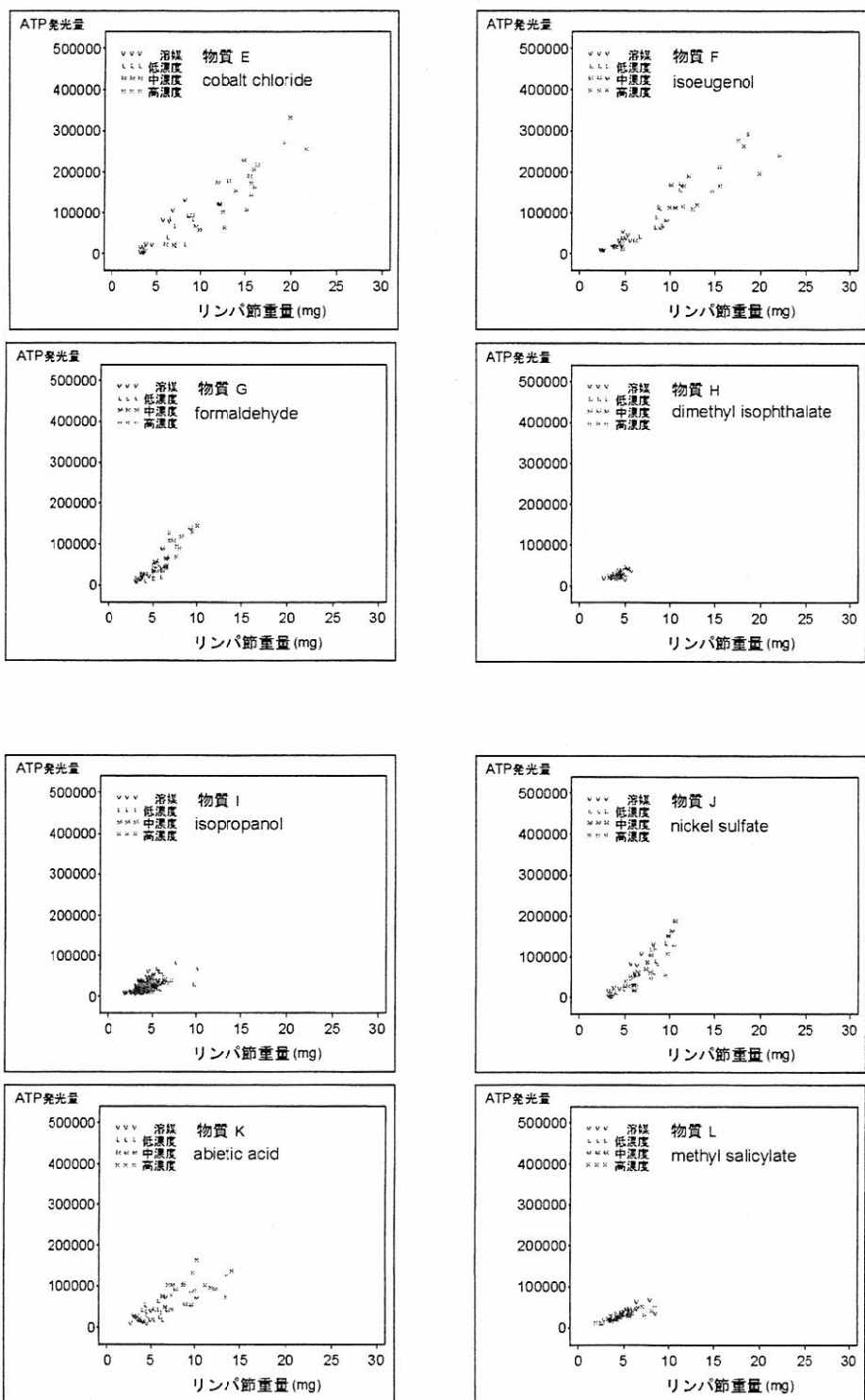


図 3.4.1 リンパ節重量と ATP 発光量の関係 (つづき)

3.5 LLNA-DA 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 3.5.1, 図 3.5.2 にそれぞれ予備実験, 本実験における各実験の陽性対照物質の SI 値とその 95%信頼区間を示す。

これらの図よりいずれも陽性と判定する基準値である SI 値 3 を超えていた。従ってこの試験法は十分な分析感度を持つと判断された。

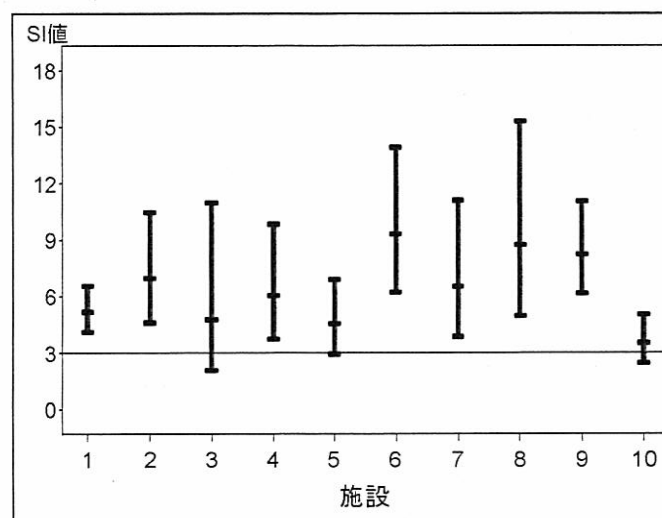


図 3.5.1 予備実験における陽性対照の SI 値とその 95%信頼区間

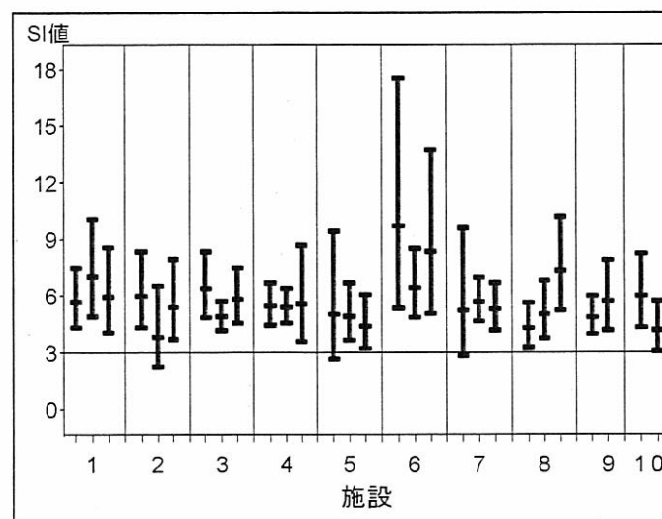


図 3.5.2 本実験における陽性対照の SI 値とその 95%信頼区間

3.6 各被験物質の用量反応関係

表 3.6.1 に施設ごとの SI 値の値を，図 3.6.1 に SI 値の用量反応関係を示す．
 図中 con と示されているのは，メタ・アナリシスによる SI 値の重み付き平均を示している．

被験物質 A (2,4-dinitrochlorobenzene)，B (hexylcinnamic aldehyde)，F (isoeugenol)，K (abietic acid) では各施設で明確な用量反応関係がみられ，高濃度での SI 値は 3 を超えていた．被験物質 H (dimethyl isophthalate)，I (isopropanol)，L (methyl salicylate) は実施された濃度の範囲では SI 値の値は小さく，用量反応関係は明確ではなく，陰性物質であることが示唆された．被験物質 C (3-aminophenol) は 3 施設すべてで SI 値が 3 よりも小さくなったが，施設 1 と 8 では SI 値は 3 にきわめて近い値となった．被験物質 D (glutaraldehyde) と G (formaldehyde) では高濃度で SI 値が 3 を超える施設とそうではない施設があった．しかし，用量反応関係がみられ 3 を超えなかった施設の SI 値は高濃度で 3 に近い値をとっている．個々の施設の結果を統合した重み付き平均の結果は高濃度で 3 を超えるものとなった．溶媒の値が施設によって大きく異なった被験物質 E (cobalt chloride) と J (nickel sulfate) は施設により結果が大きく異なった．被験物質 E (cobalt chloride) では施設間差が重み付き平均に影響し用量反応関係は V 字型となった．

表 3.6.1.a 各施設の SI 値 (被験物質 A : 2,4-dinitrochlorobenzene)

被験物質	濃度	施設									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A: 2,4-dinitrochlorobenzene	0.03%	2.84	2.33	2.26	2.99	1.52	2.75	3.83	2.42	2.80	1.16
	0.10%	5.41	2.69	4.23	4.90	3.84	4.26	5.39	3.04	4.18	2.10
	0.30%	11.97	9.23	9.96	8.53	13.97	15.14	13.18	12.60	10.89	4.71

表 3.6.1.b 各施設の SI 値 (被験物質 B : hexylcinnamic aldehyde)

被験物質	濃度	施設									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
B: hexylcinnamic aldehyde	5%	1.35	1.37	1.36	1.49	1.22	1.67	1.54	1.36	0.86	1.40
	10%	3.01	2.65	2.30	3.23	1.85	2.34	4.24	4.16	2.22	2.73
	25%	5.78	4.82	4.44	5.11	3.97	5.50	7.09	10.22	3.88	3.51

表 3.6.1.c 各施設の SI 値 (被験物質 C : 3-aminophenol)

被験物質	濃度	施設		
		1	3	8
C: 3-aminophenol	1%	1.75	1.41	1.22
	3%	2.32	1.76	1.99
	10%	2.83	1.74	2.38

表 3.6.1.d 各施設の SI 値 (被験物質 D : glutaraldehyde)

被験物質	濃度	施設		
		1	2	5
D: glutaraldehyde	0.05%	1.43	0.74	1.04
	0.15%	4.05	1.29	2.45
	0.50%	5.00	3.39	2.57

表 3.6.1.e 各施設の SI 値 (被験物質 E : cobalt chloride)

被験物質	濃度	施設		
		4	6	8
E: cobalt chloride	0.30%		10.52	4.42
	1.00%	2.03	10.63	6.62
	3.00%	2.66	20.55	8.07

表 3.6.1.f 各施設の SI 値 (被験物質 F : isoeugenol)

被験物質	濃度	施設		
		4	5	9
F: isoeugenol	1%	2.94	1.92	2.58
	3%	4.09	1.99	3.23
	10%	6.11	9.84	7.09

表 3.6.1.g 各施設の SI 値 (被験物質 G : formaldehyde)

被験物質	濃度	施設		
		1	2	5
G: formaldehyde	0.5%	2.91	1.69	1.19
	1.5%	2.86	3.03	1.88
	5.0%	4.84	3.18	2.69

表 3.6.1.h 各施設の SI 値 (被験物質 H : dimethyl isophthalate)

被験物質	濃度	施設		
		1	3	7
H: dimethyl isophthalate	5%	1.34	1.00	1.26
	10%	1.15	0.96	1.14
	25%	1.10	0.67	1.05

表 3.6.1.i 各施設の SI 値 (被験物質 I : isopropanol)

		施設									
被験物質	濃度	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I: isopropanol	10%	1.54	0.91	1.01	1.57	0.53	1.97	1.45	1.21	0.63	0.91
	25%	1.10	0.85	0.66	0.90	0.76	0.90	0.91	1.01	0.70	1.06
	50%	1.17	0.81	0.86	0.80	0.71	1.30	0.83	1.11	0.51	1.25

表 3.6.1.j 各施設の SI 値 (被験物質 J : nickel sulfate)

		施設		
被験物質	濃度	4	6	8
J: nickel sulfate	1%	1.16	5.26	3.49
	3%	1.52	6.68	3.07
	10%	1.03	11.78	2.55

表 3.6.1.k 各施設の SI 値 (被験物質 K : abietic acid)

		施設		
被験物質	濃度	2	6	7
K: abietic acid	5%	2.10	1.82	1.87
	10%	3.51	4.14	3.98
	25%	4.64	7.96	3.80

表 3.6.1.l 各施設の SI 値 (被験物質 L : methyl salicylate)

		施設		
被験物質	濃度	3	7	10
L: methyl salicylate	5%	1.07	1.09	0.63
	10%	1.10	1.77	0.78
	25%	1.55	1.39	0.83

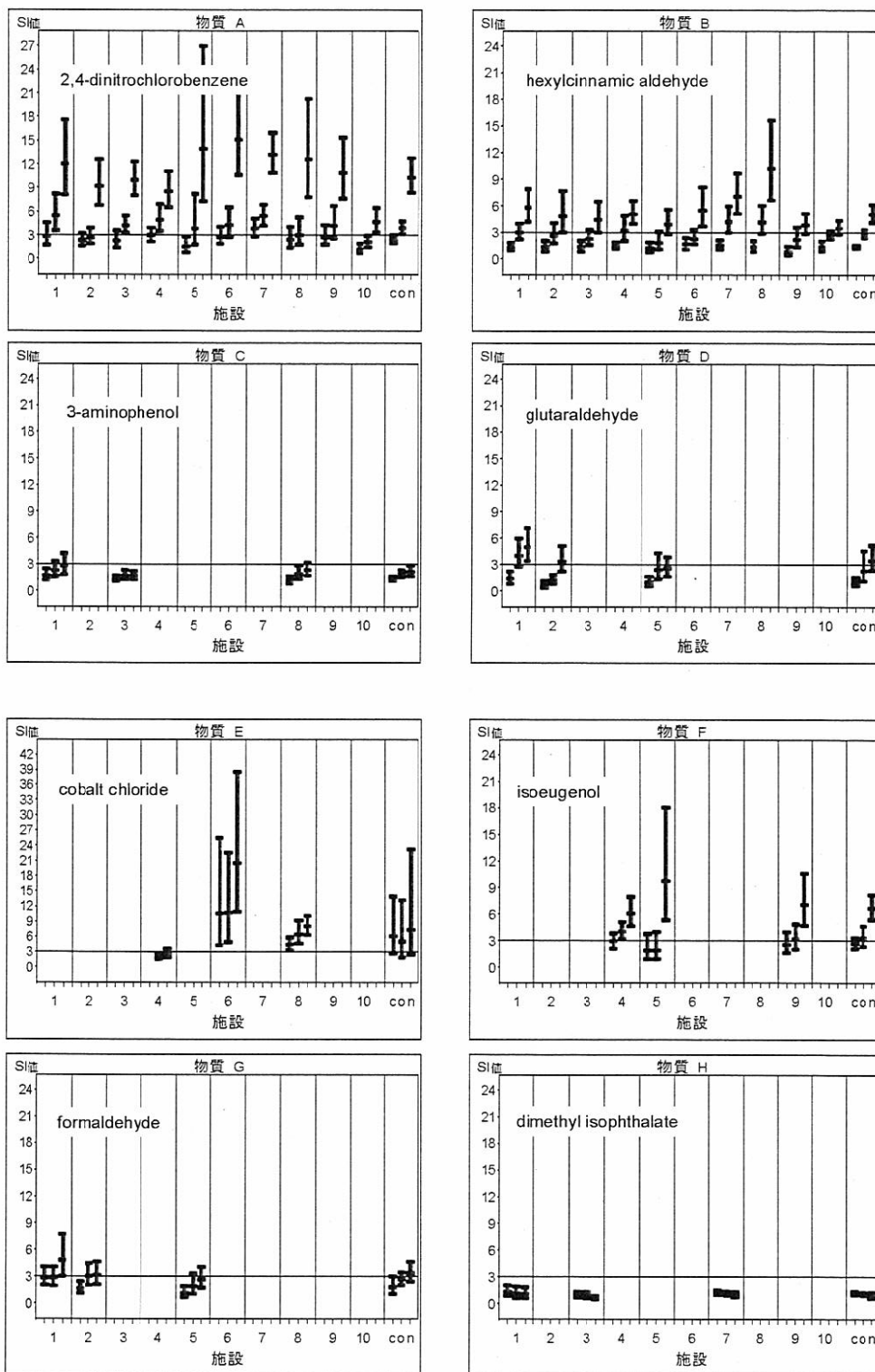


図 3.6.1 SI 値の用量反応関係

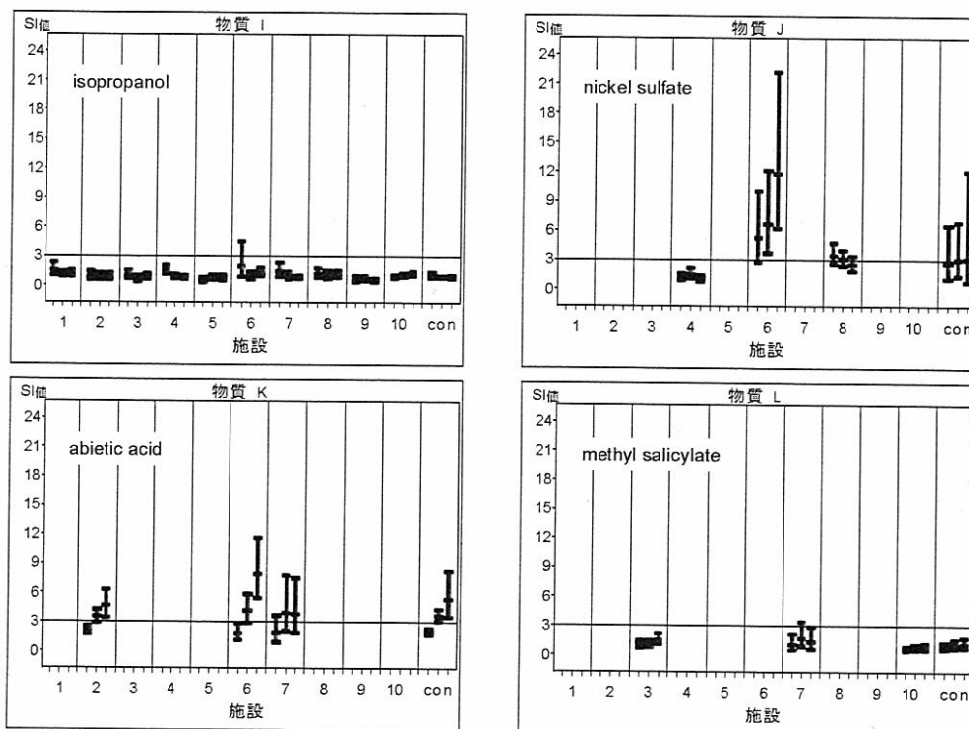


図 3.6.1 SI 値の用量反応関係 (続き)

3.7 施設間の再現性

施設間再現性は、 $\exp(\tau^2)$ に基づき評価した。各被験物質の SI 値（図 3.6.1）から計算した $\exp(\tau^2)$ の値と重み付き平均、その 95%信頼区間を表 3.7.1 に示す。

施設間差が大きいと判断できる $\exp(\tau^2)$ の基準値はないが、図 3.6.1 と施設間分散の値をみると施設間分散がおおよそ 1.2 より小さい場合にはばらつきは小さく施設間差は大きくはないといえるであろう。仮に 1.2 を基準とするとこの値より大きな値をとっているのは、被験物質 E (cobalt chloride) と J (nickel sulfate) のすべての濃度、被験物質 D (glutaraldehyde) の中濃度であった。

表 3.7.1 各被験物質のばらつきの指標施設間分散の値

被験物質	低濃度			中濃度			高濃度		
	SI値	95%信頼区間	$\exp(\tau^2)$	SI値	95%信頼区間	$\exp(\tau^2)$	SI値	95%信頼区間	$\exp(\tau^2)$
A: 2,4-dinitrochlorobenzene	2.47	(2.00 , 3.04)	1.07	3.88	(3.14 , 4.80)	1.08	10.34	(8.36 , 12.79)	1.09
B: hexylcinnamic	1.39	(1.24 , 1.56)	1.00	2.84	(2.45 , 3.30)	1.03	5.08	(4.20 , 6.15)	1.07
C: 3-aminophenol	1.42	(1.21 , 1.66)	1.00	1.97	(1.61 , 2.41)	1.00	2.20	(1.65 , 2.92)	1.04
D: glutaraldehyde	1.03	(0.71 , 1.51)	1.06	2.33	(1.19 , 4.59)	1.36	3.56	(2.42 , 5.24)	1.08
E: cobalt chloride	6.12	(2.69 , 13.93)	1.30	5.01	(1.91 , 13.18)	1.95	7.43	(2.37 , 23.27)	2.64
F: isoeugenol	2.71	(2.16 , 3.40)	1.00	3.35	(2.39 , 4.69)	1.05	6.72	(5.47 , 8.25)	1.00
G: formaldehyde	1.84	(1.10 , 3.06)	1.18	2.71	(2.13 , 3.44)	1.00	3.41	(2.47 , 4.69)	1.03
H: dimethyl isophthalate	1.19	(1.01 , 1.40)	1.00	1.09	(0.93 , 1.28)	1.00	0.90	(0.65 , 1.24)	1.06
I: isopropanol	1.07	(0.84 , 1.36)	1.11	0.92	(0.82 , 1.03)	1.00	0.92	(0.77 , 1.1)	1.06
J: nickel sulfate	2.69	(1.11 , 6.52)	1.75	3.06	(1.36 , 6.88)	1.60	3.07	(0.78 , 12.12)	4.15
K: abietic acid	2.05	(1.75 , 2.40)	1.00	3.67	(3.10 , 4.34)	1.00	5.41	(3.54 , 8.27)	1.09
L: methyl salicylate	0.87	(0.59 , 1.28)	1.08	1.07	(0.72 , 1.59)	1.08	1.21	(0.79 , 1.85)	1.09

参考として、いずれかの濃度で SI 値が 3 を超えた場合を陽性、そうでない場合を陰性とした場合の各施設の判定結果を表 3.7.2 に示す。

施設によって異なる判定がされたのは、被験物質 D (glutaraldehyde), E (cobalt chloride), G (formaldehyde), J (nickel sulfate) であった。

表 3.7.2 各施設での個々の物質の判定結果

被験物質	感作性*		施設									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A: 2,4-dinitrochlorobenzene	+	Extreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B: hexylcinnamic aldehyde	+	Moderate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C: 3-aminophenol	+	Moderate	-		-					-		
D: glutaraldehyde	+	Extreme	+	+			-					
E: cobalt chloride	+	Strong				-		+		+		
F: isoeugenol	+	Moderate				+	+				+	
G: formaldehyde	+	Strong	+	+			-					
H: dimethyl isophthalate	-	Negative	-		-				-			
I: isopropanol	-	Negative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J: nickel sulfate	-	Negative				-		+		+		
K: abietic acid	+	Weak		+				+	+			
L: methyl salicylate	-	Negative			-				-			-

*:LLNA法の評価結果に基づく感作性の判定

3.8 施設内の再現性

各施設の各実験から得られた陽性対照の SI 値（図 3.5.2）について，施設ごとに $\exp(\tau^2)$ を計算した結果を表 3.8.1 に示す．この計算には予備実験の陽性対照は含めていない．

陽性対照物質の $\exp(\tau^2)$ はすべての施設で小さい値であった。

表 3.8.1 陽性対照による施設内再現性

施設	SI値	95%信頼区間	$\exp(\tau^2)$
1	6.11	(5.07 , 7.37)	1.00
2	5.37	(4.29 , 6.73)	1.00
3	5.54	(4.70 , 6.53)	1.01
4	5.46	(4.81 , 6.19)	1.00
5	4.73	(3.85 , 5.82)	1.00
6	7.35	(5.73 , 9.42)	1.01
7	5.54	(4.78 , 6.42)	1.00
8	5.38	(3.97 , 7.29)	1.05
9	5.15	(4.33 , 6.12)	1.00
10	5.03	(3.55 , 7.13)	1.04

3.9 代替可能性

3.9.1 感度, 特異度, 一致割合

表 3.9.1 は, この研究で用いられた被験物質における GPMT/BT 法と LLNA-DA 法の分割表である. LLNA-DA 法の判定は, SI 値の重み付き平均に基づいている. 被験物質が 11 しかない理由は, 被験物質 D (glutaraldehyde) は GPMT/BT 法の結果がないためである.

表 3.9.2 は LLNA-DA 法と被験物質リストに結果が記載されている LLNA 法の分割表である.

表 3.9.3 は被験物質のリストに記載されいてる LLNA 法と GPMT/BT 法の判定結果を用いて, 選択した 11 物質で構成した分割表である. この表に基づいて計算した LLNA 法の代替可能性の能力 (感度や特異度など) は, 表 3.9.1 に基づいて計算した値とを比較する際に用いることができる.

表 3.9.1 GPMT-BT 法と LLNA-DA 法の分割表

		LLNA-DA法		合計
		+	-	
GPMT/BT法	+	7	1	8
	-	0	3	3
合計		7	4	11

表 3.9.2 LLNA-DA 法と LLNA 法の分割表

		LLNA-DA法		合計
		+	-	
LLNA法	+	7	1	8
	-	1	3	4
合計		8	4	12

表 3.9.3 GPMT-BT 法と LLNA 法の分割表

		LLNA法		合計
		+	-	
GPMT/BT法	+	7	1	8
	-	0	3	3
合計		7	4	11

表 3.9.4 に表 3.9.1 から表 3.9.3 により計算された感度，特異度，一致割合，陽性予測度，陰性予測度の値を示す。

この表からわかるように検討した被験物質の範囲で LLNA-DA 法は LLNA 法と同等の代替可能性を有していると考えられる。

表 3.9.4 代替可能性の指標

	n	感度	特異度	一致割合	陽性予測度	陰性予測度
LLNA-DA法 vs GPMT/BT法	11	87.5% (7/8)	100% (3/3)	90.9% (10/11)	100% (7/7)	75.0% (3/4)
LLNA-DA法 vs LLNA法	12	87.5% (7/8)	75.0% (3/4)	83.3% (10/12)	88% (7/8)	75.0% (3/4)
LLNA法 vs GPMT/BT法*	11	87.5% (7/8)	100% (3/3)	90.9% (10/11)	100% (7/7)	75.0% (3/4)

*：被験物質リスト中の判定での結果

3.9.2 EC3

SI 値の重み付き平均により求めた EC3 の値を表 3.9.5 に示す。

施設間再現性の低い物質 E (cobalt chloride) と J (nickel sulfate) について、重み付き平均を用いることは適切ではないかもしれない。E (cobalt chloride) については用量反応関係が判定基準である 3 をまたいで V 字型となったために、カテゴリー分類のアルゴリズムが適用できず表 2.1 に示す判定ができなかった。この物質については、全ての濃度で SI 値の重み付き平均が 3 を超えているので、表 3.9.5 には Positive と表示した。

表 3.9.5 EC3 にもとづく感作性の判定

被験物質	LLNA-DA法		LLNA法 EC3	LLNA法 感作性
	EC3	感作性		
A: 2,4-dinitrochlorobenzene	0.06	extreme	0.04	extreme
B: hexylcinnamic aldehyde	11.1	weak	8.4	moderate
C: 3-aminophenol	.	negative	3.2	moderate
D: glutaraldehyde	0.3	strong	0.1	extreme
E: cobalt chloride	.	(positive)*	0.5>	strong
F: isoeugenol	1.9	moderate	1.8	moderate
G: formaldehyde	3.0	moderate	0.7	strong
H: dimethyl isophthalate	.	negative	.	negative
I: isopropanol	.	negative	.	negative
J: nickel sulfate	2.7	moderate	.	negative
K: abietic acid	7.9	moderate	14.7	weak
L: methyl salicylate	.	negative	.	negative

*: SI 値の重み付き平均がすべての濃度で 3 を超えているが、用量反応関係が V 字型を示したために、EC3 の値を算出できなかった。

4. 考察

4.1 本研究の位置づけと意義

本研究の位置付け

OECD (2005) のガイドライン 34 の用語集には、Catch-up バリデーション研究とは *"A validation study for a test method that is structurally and functionally similar to a previously validated and accepted 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-DA 法は LLNA 法におけるエンドポイントの改良法であり、両試験法の原理は同じである。そして、本研究に用いた被験物質は、LLNA 法の性能を評価するために実施された被験物質を用いた。したがって、本バリデーション研究は、上記の Catch-up バリデーション研究に該当するといえるであろう。

12 被験物質により実施された LLNA-DA 法による判定と GPMT/BT 法の文献に記載された判定とを比較した。その結果は、同じ 12 物質で評価した LLNA 法の文献に記載された判定と GPMT/BT 法の文献に記載された判定とを比較した結果と同程度であった。また、LLNA-DA 法による判定結果を LLNA 法の文献値と比較した場合、高い一致度合いを示した。これらの結果より LLNA-DA 法は十分な代替可能性を持っているといえる。

本研究の特徴的な点

本バリデーション研究では、3 物質について 10 施設からなる実験施設の施設間再現性を評価した。LLNA 法に関しては、過去に複数の施設間再現性の評価結果が報告されている (Basketter ら (1991), Kimber ら (1991, 1995, 1998), Scholes ら (1992), Loveless ら (1996))。しかし、多くの報告で施設の規模は 5 施設程度であり、しかも必ずしも実験操作手順は同一ではない。

本研究は 3 物質について 10 施設が同一プロトコールで実験を実施している。このような規模での施設間再現性の評価は、過去の LLNA 法の研究では行われていない。

施設間差を少なくするために、本研究では、技術研修会を実施し、陽性対照物質を用いた予備実験を行い、データシートを作成してデータの入力フォーマットの統一を行った。これらの配慮は結果に反映されていると思われる。被験物質名は遮蔽されていたにもかかわらず、10 施設という規模で実施された 3 つ

の被験物質および陽性対照物質は良好な施設間再現性を示した。

4.2 本研究で評価した LLNA-DA 法の操作上の特徴

本研究で評価した試験法である LLNA-DA 法は、感作性の評価に関する原理は LLNA 法と同じである。LLNA-DA 法の特徴は、エンドポイントを ATP 発光量の測定としていることである。ATP 発光量の測定操作は極めて簡便であり、測定結果は迅速に得ることができる。一方、リンパ節中の ATP 量は動物の死亡後経時的に減少するため、測定操作は正確かつ迅速に行う必要がある。実験操作によるばらつきが大きくなるように、この研究で特に以下の点について注意を促した。

- ・ 細胞懸濁液の調製の際、潰した組織がスライドグラス上で乾燥すると十分な掻き取りができないので、PBS で濡らしながら丁寧に、かつ迅速に操作すること。
- ・ 細胞懸濁液の調製の際、細胞懸濁液をできるだけ均一にすること。
- ・ 動物の安楽死から ATP 発光量測定までを一定の時間内に終えること。そのため、安楽死させた動物の処置は途中で滞留することなく一連の操作で速やかに行うこと。
- ・ ATP 発光量の測定の際、発光量は発光試薬添加後速やかに減少するため、発光試薬添加後すばやく測定すること。

4.3 本研究の妥当性

4.3.1 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 3）の中から 12 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、12 被験物質の感作性の内訳は、無が 4 物質、弱が 4 物質、強が 4 物質である。

4.3.2 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することまではできなかった。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（別添 5）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。

実験を実施する前に、すべての施設で使用する ATP 発光量の測定機器の校正

を実施し、問題がないことを確認した。

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（別添 6）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。

4.3.3 施設内再現性

限定された結果であるが、陽性対照物質である 25%HCA-AOO 溶液に関しては各施設で 2 ないし 3 回の繰り返しがある。陽性対照物質の SI 値は、すべての施設のすべての実験で基準値である 3 を超えた。

本研究で用いたばらつきの指標 $\exp(\tau^2)$ で実験間の再現性を評価した場合、その値は施設によって 1.00 から 1.05 の範囲であった（表 3.7.2）。最大値である 1.05 は、同じ指標を用いて施設間差を評価した場合に比べると大きくはないことがわかる（表 3.7.6）。

これらの結果から、陽性対照物質での施設内再現性は高いといえる。

4.3.4 施設間再現性

12 物質中 10 施設で実験を行った 3 物質（物質 A (2,4-dinitrochlorobenzene), B (hexylcinnamic aldehyde), I (isopropanol)）は、用量反応関係、SI 値に基づく感作性の判定、各濃度の SI 値に関して高い施設間再現性を示した。

3 施設で実験を行った残り 9 物質中、5 物質（物質 C (3-aminophenol), F (isoeugenol), H (dimethyl isophthalate), K (abietic acid), L (methyl salicylate)）も用量反応関係、SI 値に基づく感作性の判定、各濃度の SI 値に関して高い施設間再現性を示した。

物質 D (glutaraldehyde) と G (formaldehyde) の 2 物質は、SI 値に基づく感作性の判定では施設間差が生じたが、用量反応関係、各濃度の SI 値に関しては高い施設間再現性であった。つまり、これらの 2 物質の高濃度での SI 値は判定の基準値である 3 前後であり、実験による変動が影響したと考えられる。本研究では濃度は固定されているのでより高濃度での実験は実施されていないが、現実にある特定の物質を評価する場合に用量反応がみられかつ高濃度で SI 値が 3 よりもわずかに小さな値であれば、さらに高い濃度での実験が実施されるであろう。

被験物質 E (cobalt chloride) と J (nickel sulfate) では、施設間の SI 値は

大きなかい離が生じた。12 被験物質中で、これら 2 物質のみが金属塩であり、DMSO を溶媒としていた。さらに両物質とも送付された時点で、析出していたり、沈殿していたり、結晶が生じていたため、これら 2 物質を実験した施設では、それぞれ独自の対処がされた。また、DMSO 溶液はマウスへの塗布が困難とされている。すなわち、これら 2 物質における SI 値のかい離は、溶媒に用いた DMSO が関与した可能性がある。

4.3.5 比較対照とした対象となる試験法のデータの妥当性

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。

4.3.6 対象となる試験法のデータとの対応性

対象となる試験法との対応性として、GPMT/BT 法を基準とした LLNA-DA 法の感度は 87.5% (7/8)、特異度は 100% (3/3)、一致割合は 90.9% (10/11) であった。この結果は、本研究で用いた同じ物質に 12 被験物質について、被験物質の候補リスト (資料 3) に記載された文献値上で GPMT/BT 法を LLNA 法と比べた結果と同じ結果であった。つまり、この研究で用いた被験物質における結果に関して、LLNA-DA 法は LLNA 法と同等な性能を持つといえる。

また、LLNA 法を基準とした LLNA-DA 法の対応性は、感度 87.5% (7/8)、特異度 75.0% (3/4)、一致割合 83.3% (10/12) であった。つまり、LLNA 法の判定で陽性のものを LLNA-DA 法で陰性と判定した被験物質が 1 物質 (C (3-aminophenol)) あり、一方で LLNA 法で陰性と判定された物質で LLNA-DA 法で陽性と判定された物質が 1 物質 (J (nickel sulfate)) あった。

4.3.7 個々の被験物質に対する考察

被験物質 A (2,4-dinitrochlorobenzene) は、割付に考慮した分類に基づくと強 (extream) に分類され、結果は 10 施設のすべてで陽性と判定された。施設 10 で SI 値が 4.71 とやや低めの値をとっているが、これは溶媒の ATP 発光量が大きかったためであると思われる。

被験物質 B (hexylcinnamic aldehyde) は、割付に考慮した分類に基づくと弱 (moderate) に分類され、結果は 10 施設のすべてで陽性と判定された。

被験物質 C (3-aminophenol) は、割付に考慮した分類に基づくと (moderate) に分類される。3 施設すべてで陰性と判定され、文献の LLNA 法の判定とかい離が生じた。3 施設での、高濃度 (10%) での SI 値の値はそれぞれ 2.83, 1.74, 2.38 であり、すべての施設で陰性と判定された被験物質 H (dimethyl isophthalate) や被験物質 I (isopropanol) での SI 値よりは大きかった。本研

究では、適用濃度が固定されており、より高い濃度での実験は行われなかったが、全体として用量反応関係がみられるので、現実に応用される場合には、より高濃度での実験が行われると思われる。その場合には、陽性と判断される可能性がある。

被験物質 D (glutaraldehyde) は、割付に考慮した分類に基づく強 (extreme) に分類される。3 施設のうち 2 施設で陽性と判定されたが、1 施設で陰性と判定された。3 施設の高濃度である 0.5% での SI 値はそれぞれ 5.0, 3.39, 2.57 とそれほど大きな値ではなかった。しかし、いずれの施設でも SI 値に用量反応関係があるので、現実には陰性と判定された場合でもより高い用量での実験が行われると思われる。

被験物質 E (cobalt chloride) は、割付に考慮した分類に基づく強 (strong) に分類される。この物質の施設間差は大きく、3 施設の高用量 (3%) での SI 値はそれぞれ 2.66, 20.55, 8.07 であった。これは、個々の施設での溶媒の ATP 発光量の違いによるところが大きいと思われる。ATP 発光量の値は施設によって桁が異なるほど違いが大きいので、塗布操作に何か問題があったのかもしれない。

被験物質 F (isoeugenol) は、割付に考慮した分類に基づく弱 (moderate) に分類される。3 施設のすべてで SI 値は 10 より小さく陽性と判定されている。

被験物質 G (formaldehyde) は、割付に考慮した分類に基づく強 (strong) に分類される。3 施設のうち 2 施設で陽性と判定されたが、1 施設で陰性と判定された。いずれの施設でも SI 値に用量反応関係はあり、高濃度である 5% での SI 値はそれぞれ 4.84, 3.18, 2.69 であった。

被験物質 H (dimethyl isophthalate) は、割付に考慮した分類に基づく無 (negative) に分類される。3 施設すべてで陰性と判定され、SI 値の用量反応関係もみられなかった。

被験物質 I (isopropanol) は、割付に考慮した分類に基づく無 (negative) に分類される。10 施設すべてで陰性と判定され、SI 値の用量反応関係もみられなかった。

被験物質 J (nickel sulfate) は、割付に考慮した分類に基づく無 (negative) に分類される。ただし、この物質の感作性は一般によく知られており、LLNA 法では偽陰性となっている。この被験物質の施設間差は大きく、3 施設の高用量 (10%) での SI 値はそれぞれ 1.03, 11.78, 2.55 であった。この 3 施設は被験物質 E (cobalt chloride) と組みで実験が行われたため、被験物質 E (cobalt chloride) と同様の傾向が生じていると思われる。

被験物質 K (abietic acid) は、割付に考慮した分類に基づく弱 (weak) に分類される。3 施設の高用量 (25%) での SI 値はすべて 3 を超えており、値は

それぞれ 4.64, 7.96, 3.80 とそれほど大きな値ではなかった。

被験物質 L (methyl salicylate) は、割付に考慮した分類に基づくと無 (negative) に分類される。3 施設すべてで陰性と判定され、SI 値の用量反応関係もみられなかった。

別添 9 に、いくつかの文献で報告されている各物質に関する LLNA 法の SI 値を示した。各物質の対応する濃度と本研究で得られた SI 値とを比べると、陽性と判定された多くの物質の高濃度では LLNA 法の方が高めの傾向を示している。これはエンドポイントの違いに起因すると考えられる。このような傾向はあるものの、カットオフ値として定めた SI 値の判定基準が 3 となる濃度付近では 2 つの方法に大きな差は認められない。

4.4 本研究の限界と今後の課題

本研究にはいくつかの限界がある。以下にこのことについて記載する。

- ・被験物質について

本研究の結果、LLNA-DA 法は良好な施設間再現性と代替可能性を示した。しかしながら、本研究で評価に用いた被験物質数はわずか 12 物質のみである。特に代替可能性の検討では、1 物質の結果の評価の違いが、感度などの指標に大きく影響してしまう。全般的に施設間再現性は良好な結果であったので、今後は、提案施設を中心に、より多くの物質での実験を行い、結果の蓄積が必要である。

被験物質 E (cobalt chloride) と J (nickel sulfate) の施設間再現性が悪かった。理由のひとつ溶媒に DMSO が用いられていたことが考えられる。DMSO を溶媒として用いる他の被験物質で追加実験を行う必要があるかもしれない。また、これらの物質は金属塩なので、これらの物質に類似するような物性をもつ物質について実験を行って確かめる必要があるかもしれない。

- ・実験施設

本研究を遂行するにあたり、実験施設は LLNA 法もしくはその改良法の実施経験のある施設を選んだ。施設間再現性のよさが、実施経験の少ない施設で同じように示すことができるかどうかは、本報告が示す結果のみでは明確ではない。

- ・本研究特有の事項

本研究では、各被験物質はあらかじめ調製されて実験施設に送付された。こ

のため被験物質の析出が認められた物質について各実験施設で改めて調製を行うことはできなかった。しかし、通常の実験では、析出等が認められた場合に再度被験物質の調製が実施されるであろう。本研究ではこの点が結果に与える影響について把握できない。

5. 結論

統一された SOP に基づき、LLNA 法や GPMT/BT 法で結果が知られている 12 物質を用いて多施設バリデーション研究を実施した結果、LLNA-DA 法は施設間差が小さく、GPMT/BT 法に対する代替可能性は LLNA 法と同等である試験法であることが確認された。

謝辞

本研究は厚生労働科学研究「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」班，日本動物実験代替法学会の協力を得ました．本研究に対する理解と支援に感謝いたします．

本研究は，多くの方の協力を得ました．彼らの協力なしでは本研究を行うことができませんでした．以下の方々に心より感謝いたします．

上森健至（ダイセル化学工業株式会社），山岸学（ダイセル化学工業株式会社），山下邦彦（ダイセル化学工業株式会社），小濱とも子（国立医薬品食品衛生研究所），古谷真美（財団法人食品薬品安全センター），森村智美（財団法人食品薬品安全センター），志田勝彦（財団法人食品薬品安全センター），白石啓二（財団法人化物質評価研究機構），飯田憲二（財団法人化物質評価研究機構），東原信彦（財団法人化物質評価研究機構），森本隆史（住友化学株式会社），正門孝臣（住友化学株式会社），檜垣環（住友化学株式会社），後藤浩彦（大塚製薬株式会社），白石明（明治製菓株式会社），織原由佳里（大正製薬株式会社），山崎紀世（大正製薬株式会社），小宮千春（富士フイルム株式会社），吉野幸江（富士フイルム株式会社），藤島敦（財団法人食品農医薬品安全性評価センター），竹原広（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）

参考文献

- Basketter, D. A., Scholes, E. W., Kimber, I., Botham, P. A., Hilton, J., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C. and Waite, S. J. (1991) Interlaboratory evaluation of the local lymph node assay with 25 chemicals and comparison with guinea pig test data. *Toxicology Methods* **1**, 30–43.
- Basketter, D. A. and Scholes, E. W. (1992) Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. *Food and Chemical Toxicology* **30**, 65–69.
- Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I. and Loveless, S. E. (1996) The local lymph node assay: a viable alternative to currently accepted skin sensitization tests. *Food and Chemical Toxicology* **34**, 985–997.
- Basketter, D. A., Gerberick, G. F. and Kimber, I. (1998) Strategies for identifying false positive responses in predictive skin sensitization tests. *Food and Chemical Toxicology* **36**, 327–333.
- Basketter, D. A., Lea, L. J., Cooper, K. J., Ryan, C. A., Gerberick, G. F., Dearman, R. J. and Kimber, I. (1999) Identification of metal allergens in the local lymph node assay. *American Journal of Contact Dermatitis* **10**, 207–212.
- Basketter, D. A., Lea, L. J., Dickens, A., Briggs, D., Pate, I., Dearman R. J. and Kimber I. (1999) A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. *Journal of Applied Toxicology* **19**, 261–266.
- Basketter, D. A., Blaikie, L., Dearman, R. J., Kimber, I., Ryan, C. A., Gerberick, G. F., Harvey P., Evans, P., White, I. R. and Rycroft, R. J. G. (2000) Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* **42**, 344–348.
- Basketter, D. A., Evans, P., Fielder, R. J., Gerberick, G. F., Dearman, R. J. and Kimber, I. (2002) Local lymph node assay – validation, conduct and use in practice. *Food and Chemical Toxicology* **40**, 593–598.
- Basketter, D. A., Casati, S., Gerberick, G. F., Griem P., Philips B. and Worth A. (2005) Skin sensitisation. *Alternatives To Laboratory Animals* **33** supplement 1, 83–103.
- Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Hattan, D. G. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node

- assay. II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **34**, 258–273.
- Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kimber, I., Dearman, R. J. and Basketter D. A. (2000) Local lymph node assay: Validation assessment for regulatory purposes. *Toxicology* **11**, 3–18.
- Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kern, P. S., Dearman, R. J., Kimber, I., Patlewicz, G. Y. and Basketter, D. A. (2004) A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin sensitization testing. *Contact Dermatitis* **50**, 274–288.
- Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **34**, 274–286.
- Kimber, I., Hilton, J., Botham, P. A., Basketter, D. A., Scholes, E. W., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C., Gray, T. J. B. and Waite, S. J. (1991) The murine local lymph node assay: results of an inter-laboratory trial. *Toxicology Letters* **55**, 203–213.
- Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Scholes, E. W., Ladics, G. S., Loveless, S. E., House, R. V. and Guy A. (1995) An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. *Toxicology* **103**, 63–73.
- Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Lea, L., House, R. V., Ladics, G. S., Loveless, S. E. and Hastings K. L. (1998) Assessment of the skin sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: an interlaboratory evaluation. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **53**, 563–579.
- Loveless, S. E., Ladics, G. S., Gerberick G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Scholes, E. W., House, R. V., Hilton, J., Dearman, R. J. and Kimber, I. (1996) Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial. *Toxicology* **108**, 141–152.
- Normand, S. L. T. (1999) Meta-analysis: formulating, evaluating, combining, and reporting. *Statistics in Medicine* **18**, 321–359.
- OECD (1992) Organization for Economic Co-operation and Development – OECD guidelines for testing of chemicals. No. 406: Skin sensitization.

- OECD (2002) Organization for Economic Co-operation and Development – OECD guidelines for testing of chemicals. No. 429: Skin sensitization: Local lymph node assay.
- OECD (2005) Organization for Economic Co-operation and Development – OECD series on testing and assessment. No. 34: Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment.
- Sailstad, D. M., Hattan, D., Hill, R. N. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. I. the ICCVAM review process. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **34**, 249–257.
- Scholes, E. W., Basketter, D. A., Sarll, A. E., Kimber, I., Evans, C. D., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C. and Waite, S. J. (1992) The local lymph node assay: Results of a final inter-laboratory validation under field conditions. *Journal of Applied Toxicology* **12**, 217–222.
- Yamashita K., Idehara K., Fukuda N., Yamagishi G. and Kawada N. (2005) Development of a modified local lymph node assay using ATP measurement as an endpoint. *Alternatives to Animal Testing and EXperimentation* **11**, 136–144.