

新規試験法提案書

皮膚感作性試験代替法（LLNA-BrdU 法）

平成 22 年 5 月

国立医薬品食品衛生研究所

# 新規試験法提案書

平成 22 年 5 月 17 日

No. 2010-01

## 皮膚感作性試験代替法 LLNA-BrdU 法の提案

平成 22 年 5 月 17 日に東京、国立医薬品食品衛生研究所にて開催された新規試験法評価会議（通称：JaCVAM 評価会議）において以下の提案がなされた。

提案内容：放射性同位体を用いない皮膚感作性試験 LLNA (Local Lymph Node Assay) である LLNA-BrdU 法を定められた方法で適切に利用すれば、化学物質の皮膚感作性を科学的に評価できる。

この提案書は日本動物実験代替法学会の組織するバリデーション委員会により準備された資料をもとに、放射性同位体を用いない皮膚感作性試験代替法 LLNA (Local Lymph Node Assay) である LLNA-BrdU 法のための第三者評価委員会によりまとめられた文書を用いて JaCVAM 評価会議が OECD ガイダンス文書 No.34 に従って、評価および検討した結果、OECD テストガイドライン No.429 (皮膚感作性試験 LLNA) に準じて用いることにより、その有用性が確認されたことから作成された。

以上の理由により、行政当局の安全性評価方法として「放射性同位体を用いない皮膚感作性試験 LLNA である LLNA-BrdU 法」の使用を提案するものである。

### 添付資料一覧

1. 皮膚感作性試験代替法 (LLNA-BrdU 法) の評価会議報告書
2. 皮膚感作性試験代替法 (LLNA-BrdU 法) 二次評価報告書
3. 皮膚感作性試験代替法 (LLNA-BrdU 法) 一次評価報告書
4. LLNA-BrdU 法 バリデーション研究 (第 2 実験) 報告書
5. LLNA-BrdU 法 バリデーション研究 (第 1 実験) 報告書

小島 肇



国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
薬理部 新規試験法評価室  
室長

西川秋佳



JaCVAM 評価会議 議長  
国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
センター長

## JaCVAM 評価会議

西川秋佳（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター）  
井上 達（医薬品医療機器総合機構）  
田中憲穂（食品薬品安全センター 秦野研究所）  
吉田武美（昭和大学薬学部）  
横関博雄（東京医科歯科大学）  
吉村 功（東京理科大学）  
中村和市（日本製薬工業協会）  
岡本裕子（日本化粧品工業連合会）  
大島健幸（日本化学工業協会）  
小野寺博志（医薬品医療機器総合機構）  
見田 活（医薬品医療機器総合機構）  
吉田 緑（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部）  
五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部）

## オブザーバー：

柴辻正喜（厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室）  
實国慎一（経済産業省 製造産業局 化学物質安全対策室）

## オブザーバー：JaCVAM 運営委員

大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所）  
関野祐子（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部）  
増田光輝（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部）  
小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部）  
秋田正治（日本動物実験代替法学会）

**JaCVAM statement  
on the LLNA: BrdU-ELISA for skin sensitization testing**

At the meeting concerning the above method, held on 17 May 2010 at the National Institute of Health Sciences (NIHS), Tokyo, Japan, the members of the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) Regulatory Acceptance Board [1] unanimously endorsed the following statement:

Following the review of the results of the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW)-funded validation study on the LLNA (Local Lymph Node Assay) :BrdU-ELISA coordinated by Japanese Society for Alternative to Animal Experiments (JSAAE), it is concluded that the LLNA :BrdU-ELISA can be used for distinguishing between sensitizer and non-sensitizer chemicals within the context of the OECD testing guideline No. 429 on Skin sensitization: LLNA.

The JaCVAM Regulatory Acceptance Board has been regularly kept informed of the progress of the study, and this endorsement is based on an assessment of various documents, including, in particular, the report on the results from the study, and also on the evaluation supported by JSAAE of the study prepared for the JaCVAM ad hoc peer review panel.



Hajime Kojima,

Director,  
JaCVAM,  
National Centre for Biological Safety and Research (NCBSR)  
NIHS,  
Tokyo



Akiyoshi Nishikawa,  
Director,  
NCBSR,  
NIHS,  
Tokyo

17 May, 2010

The JaCVAM Regulatory Acceptance Board was established by the JaCVAM Steering Committee, and is composed of nominees from the industry and academia.

This statement was endorsed by the following members of the JaCVAM Regulatory Acceptance Board:

Mr. Akiyoshi Nishikawa (NIHS)  
Mr. Tohru Inoue (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)  
Mr. Noriho Tanaka (Food and Drug Safety Center)  
Mr. Takemi Yoshida (Showa Univ.)  
Mr. Hiroo Yokozeki (Tokyo Medical and Dental Univ.)  
Mr. Isao Yoshimura (Tokyo Univ. of Science)  
Mr. Kazuichi Nakamura (Japan Pharmaceutical Manufacturers Association)  
Ms Yuko Okamoto (Japan Cosmetic Industry Association)  
Mr. Takeyoshi Oshima (Japan Chemical Industry Association)  
Mr. Hiroshi Onodera (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)  
Mr. Iku Mita (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)  
Ms Midori Yoshida (NIHS)  
Mr. Yoshiaki Ikarashi (NIHS)

The following members were involved as observers in the consultation process, but not in the endorsement process itself.

Mr. Masayoshi Shibatsuji (Ministry of Health, Labour and Welfare)  
Mr. Shinichi Jitsukuni (Ministry of Economy, Trade and Industry)

The following members of the JaCVAM Steering Committee were involved as observers in the consultation process, but not in the endorsement process itself.

Mr. Yasuo Ohno (NIHS)  
Ms Yuko Sekino (NIHS)  
Mr. Masaharu Akita (JSAAE)  
Mr. Mitsuteru Masuda (JaCVAM)  
Mr. Hajime Kojima (JaCVAM)

# 皮膚感作性試験(LLNA-BrdU 法)

## 目次

評価会議報告書 -----

第三者評価報告書 -----

一次評価報告書

二次評価報告書

バリデーション研究報告書 -----

第1次実験報告書

第2次実験報告書

本実験第2次解析結果報告書 Ver.0.3

バリデーション研究計画書 -----

バリデーション研究計画書 Version 1.0

第2次バリ研究計画書 (Version 1.0)

プロトコール -----

標準操作手順書 (Local lymph node assay-BrdU 法) 平成 18 年 4 月 11 日

第1次バリデーション使用

LLNA-BrdU 法実験 SOP (Version 1.01) 平成 19 年 8 月 26 日

第2次バリデーション使用

# 皮膚感作性試験（LLNA：BrdU法）の評価会議報告書

JaCVAM 評価会議

平成 22 年（2010 年）5 月 17 日  
平成 23 年（2011 年）4 月 20 日改定

## JaCVAM 評価会議

西川秋佳（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター）  
田中憲穂（食品薬品安全センター 秦野研究所）  
吉田武美（昭和大学薬学部）  
横関博雄（東京医科歯科大学）  
吉村 功（東京理科大学）  
渡部一人（日本製薬工業協会）  
岡本裕子（日本化粧品工業連合会）  
大島健幸（日本化学工業協会）  
小野寺博志（医薬品医療機器総合機構）  
小笠原弘道（医薬品医療機器総合機構）  
吉田 緑（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部）  
五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部）  
長谷川隆一（独立行政法人 製品評価技術基盤機構）  
浅野哲秀（元日東電工株式会社）

任期：平成 22 年 4 月 1 日～平成 24 年 3 月 31 日

## オブザーバー：JaCVAM 運営委員

大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所）  
関野祐子（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部）  
増田光輝（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部）  
小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部）  
秋田正治（日本動物実験代替法学会）  
柴辻正喜（厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室）  
実国慎一（経済産業省 製造産業局 化学物質安全対策室）

任期：平成 22 年 4 月 1 日～平成 23 年 4 月 30 日



皮膚感作性試験である LLNA (Local Lymph Node Assay) : BrdU 法について、第三者評価委員会からの報告を受け<sup>1)</sup>、以下の 8 項目について審議した。7 項目までは OECD ガイダンス文書 No. 34 に示された検討項目である<sup>2)</sup>。なお、本動物実験代替法の利用にあたっては、適用範囲を十分に配慮した上で使用されるべきである。

< 審議内容 >

1. 検討対象の試験法とその妥当性を示すデータは、透明で独立な評価を受けているか。
  - ・ 提案施設での性能研究の結果はすでに学術論文として公表されている。施設間バリデーション研究の結果は、学術雑誌に公開されている<sup>3)</sup>。
  - ・ その内容は、独立した専門家からなる「日本動物実験代替法学会評価委員会（大野泰雄委員長）」によって評価され、その結果が「(財) 化学物質評価研究機構より提案のあった皮膚感作性試験代替法 (LLNA : BrdU 法) の一次および二次評価報告書<sup>1)</sup>」にまとめられている。
  - ・ バリデーションの過程でプロトコルに若干の変更が行われた。
2. 当該試験法で得られるデータは、対象毒性を十分に評価あるいは予測できるものであるか。データは、当該試験法と従来の試験法の、代替法としての繋がりを示しているか。あるいは (同時に) そのデータは、当該試験法と、対象としているあるいはモデルとしている動物種についての影響との繋がりを示しているか。
  - ・ 当該試験法は、免疫毒性の皮膚感作性の試験法として認められている LLNA<sup>4)</sup> の代替法と位置づけられる試験法である。
  - ・ 従来の試験法 ( Maximization 法 : GPMT、LLNA 原法) との比較も十分になされており、代替法としての評価手順に問題はないと思われる
  - ・ 当該試験法は、放射性同位元素 (RI) <sup>3</sup>H methyl-thymidine 標識法を使わず、BrdU 標識法を使うこと以外は、LLNA 原法と同じである。
  - ・ LLNA 原法を規準とした場合、評価されている対象毒性について、感度、特異度が概ね 80%以上と高い値になっている。 LLNA 原法と同等程度の評価が可能である。
  - ・ 多施設バリデーションの結果、施設内及び施設間再現性は、LLNA 原法とほぼ同等である。
3. 当該試験法は、ハザードあるいはリスク、あるいはその両方を評価するのに有用であるか。
  - ・ LLNA 原法と同じくハザード同定に利用できると考えられるが、リスク評価には使用できない。
4. 当該試験法とその妥当性を示すデータは、その試験法で安全性を保証しようとする、行政上のプログラムあるいは関係官庁が対象としている化学物質や製品を、十分広く対象としたものとなっているか。当該試験法が適用できる条件及び適用できない条件が明確であるか。
  - ・ 可溶性物質を対象としており、固体あるいは溶解性の低い物質には適用できない。
  - ・ 刺激性物質と感作性物質の判断が難しいという適用限界もある。  
適用限界は LLNA 原法と同様である。

5. 当該試験法は、プロトコルの微細な変更に対して十分頑健で、適切な訓練経験を持つ担当者と適切な設備のある施設において、技術習得が容易なものであるか。
- ・  $^3\text{H}$  で標識された methyl-thymidine の DNA への取り込みを指標とする方法では、細胞を特に処理することなく RI 活性を測定すればよいが、LLNA : BrdU 法では細胞の事前処理が必要であり、試験結果のばらつきや施設間差を生じる要因は、LLNA 原法と比較して多くなる。当該試験法で妥当な被験物質評価が得られるためには、試験プロトコルが忠実に守られることが必要である。
  - ・ 良い性能が得られるためには、LLNA 原法と比較してやや高度な技術習得が必要である。
6. 当該試験法は、時間的経費的に有用性があり、行政上で用いられやすいものであるか。
- ・ RI を使用しない当該試験法は、LLNA 原法と比べて、法規制上、施設上の負担が軽減されるという利点がある。
  - ・ 操作時間は LLNA 原法と同等である。
  - ・ 経費が LLNA 原法より軽減されている。
- 従って、行政試験法として使用されやすいものである。
7. 当該試験法は、従来の試験法と比べて、科学的・倫理的・経済的に、新しい試験法あるいは改訂試験法であることが正当化されているか。
- ・ 科学的には、リンパ球の増殖をみているという点で、LLNA 原法と同じメカニズムである。
  - ・ LLNA 原法と比較して、倫理的な面での差は小さい。
  - ・ 実施施設・試験実施者に制限がなく、廃棄物処理の負担が軽減され、経済的な利点がある。
- LLNA 原法の改訂試験法として正当化できる。

#### 8. 安全性評価のための行政的資料として、受け入れ可能な試験法であるか。

本試験法は、皮膚感作性評価を目的とし、既存の LLNA 原法と同程度の検出力を持つ。医薬品、医薬部外品、化粧品成分及び化学物質の皮膚感作性評価に有用である。

以上の審議の結果、JaCVAM 評価会議は、皮膚感作性試験である LLNA : BrdU 法を定められた方法で注意点を適切に守って利用すれば、化学物質の感作性を科学的に評価できると結論した。

#### 参考文献

1. (財) 化学物質評価研究機構より提案のあった皮膚感作性試験代替法 (LLNA : BrdU 法) の一次及び二次評価報告書
2. OECD (2005) OECD Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, ENJ/JM/MONO(2005) 14
3. Kojima H, Takeyoshi M, Sozu T, Awogi T, Arima K, Idehara K, Ikarashi Y, Kanazawa Y, Maki E, Omori T, Yuasa A, Yoshimura I.: Inter-laboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation. J Appl Toxicol. 31(1)63-74 (2010)
4. OECD(2004) OECD guideline for the testing of chemicals, Test guideline: 429, Local Lymph

Node Assay (LLNA)

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

平成 18 年 6 月 20 日

日本動物実験代替法学会 評価委員会

委員長\*

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所)

副委員長

金澤由基子 ((財) 食品薬品安全センター 秦野研究所)

委員

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部)

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

田中憲穂 ((財) 食品薬品安全センター 秦野研究所)

筒井尚久 (三菱ウェルファーマ (株) 創薬本部 安全性研究所)

手島玲子 (国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部)

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

牧 栄二 ((財) 食品農医薬品安全性評価センター)

オブザーバー

笛木 修 ((独) 医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部)

(所属は平成 17 年 8 月 31 日現在)

(財) 化学物質評価研究機構より提案のあった

皮膚感作性試験代替法(LLNA-BrdU法)の一次評価報告書

要旨

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

## A. 目的および背景

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

## B. 評価方法

### B-1) 評価組織

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

#### 評価委員会

##### 委員長

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所)

##### 副委員長

金澤由基子 ((財) 食品薬品安全センター 秦野研究所・毒性部)

##### 委員

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所・環境衛生化学部)

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

筒井尚久 (三菱ウェルファーマ 創薬本部 安全性研究所)

手島玲子 (国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部)

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

牧 栄二 ((財) 食品農医薬品安全性評価センター)

##### オブザーバー

笛木 修 ((独) 医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部)

### B-2) 提案者

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

### B-3) 秘密の保持と評価結果の公表について

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

#### B-4) 評価に使用した資料および会議資料

主に、(財)化学物質評価研究機構より提供を受けた資料、論文、生データおよび集計データに基づいて評価した。申請時に提供された資料は以下のとおりである。

代替試験法申請書類、皮膚感作性試験：LLNA-BrdU法、(財)化学物質評価研究機構

- 資料1) 代替しようとする試験法の名称
- 資料2) 代替しようとする *in vivo* 試験法に関する資料
- 資料3) 代替法の原理に関する資料
- 資料4) 試験法の詳細なプロトコール
- 資料5) 検討した被験物質のリストと化学物質としての特性に関する資料
- 資料6) 検討した被験物質の LLNA-RI 法および LLNA-BrdU 法試験結果に関する資料
- 資料7) 試験法の感度、特異性、予測性、精度（一致率）を記載した資料
- 資料8) 試験法の特徴
- 資料9) 試験法のバリデーションと、その QC に関する資料
- 資料10) その他、データ解析上有用な資料（生データなど）
- 資料11) 論文（または、学会発表資料&印刷中の論文原稿）

なお、以下の資料は以前 LLNA-DA 法を評価した際に、事務局より委員に配布したものである。

- 資料12) OECD guideline for the testing of chemicals 429, Skin sensitization: Local lymph node assay (adopted 24<sup>th</sup> April, 2002)
- 資料13) ICCVAM immunotoxicology working group-based on an independent expert peer review panel evaluation of the LLNA. Protocol: Murine Local Lymph Node Assay (LLNA): Assessment of allergic contact dermatitis potential (January 2001)

また、今回の評価に際し、以下の評価表が配布された。

- 資料14) 化学物質評価機構より提案された皮膚感作性試験代替法の評価委員会での評価について（評価項目案）

会議の記録は以下のとおりである。

第1回 LLNA-BrdU 評価会議(2005.7.26)議事録

#### B-5) 評価の方法

評価委員会では、事前に資料を委員に配布した上で、会議を開催し、提案者より提出された申請内容を評価した。その際 LLNA-DA 法を評価した時に事務局が作成した評価項目案に基づいて行うことを事前に確認した。第一回の評価委員会では提案者から試験法についての説明を受け、委員より出された疑問点について申請者が回答したが、十分に審議する時間が無かったことから、その後、各委員より評価結果を委員長に送付し、委員長はそれをまとめ、委員に戻し、再度、e-mail を介して意見をもとめ、一次評価文書をまとめた。なお、出された疑問点については適宜提案者に問い合わせ、その回答を踏まえ一次評価を行った。

なお、今回の申請では LLNA-DA 法の場合とは異なり、多施設によるバリデーション結果が提出されていたが、OECD 基準で示されたコード化された被験物質を用いて行ったものでは無かったことから、最終評価は行えなかったものである。一次評価の結果多施設で再度バリデーションする価値があるとされた場合には代替法学会にそれを依頼する。その際、評価委員会の審議によりプロトコールなどが若干修飾される可能性があるが、その際は提案者の意向を尊重することとした。

#### C. 評価結果

##### C-1) 代替しようとする試験法

皮膚感作性試験においてはモルモットを用いた試験法が主に使用されてきた。OECD ガイドラインに掲載された方法としては、guinea-pig maximization test (GPMT)および Buehler assay (BA)がある。これらの試験法は、感作誘発期の皮膚反応を肉眼的に観察・評価することにより、モルモットに対する化学物質の感作性の有無を検出するものである。しかし、評価が主観的であること、試験に5週間を要すること、コストおよび感作誘発による動物へのストレスの問題がある。

Local lymph node assay (LLNA)法は Kimber ら(1986)により提案された皮膚感作性試験であり、マウス耳介に3日間連続して被験物質を塗布し、6日目に<sup>3</sup>H-Methyl thymidineまたは<sup>125</sup>I-Iododeoxyuridineを静脈内投与し、5時間後に摘出したリンパ節より調製したリンパ球懸濁液の放射能を測定することにより、局所

リンパ節中の細胞増殖反応を評価する試験法であり、媒体対照群の3倍以上の結果が得られたときに陽性と判定される。この方法は基本的に感作誘導期における反応を調べる方法で、従来のGPMT方法と比べ、以下のようなメリットがある。

- 1) 試験期間が1週間と短い。
- 2) 結果が数値として得られるため、客観的かつ定量的。
- 3) リンパ球の増殖は被験物質の量および感作性能に相関して起こるため、用量依存性がある。
- 4) Freund's complete adjuvant (FCA)を用いないなど動物に与えるストレスを軽減できる。
- 5) 使用動物数削減が可能。
- 6) コスト削減が可能。
- 7) 着色物質の評価が可能。
- 8) モルモットと比較してマウスの免疫系に関する情報が多くある。
- 9) 感作誘導期の評価であるため、将来的にメカニズムの研究や試験法の進歩が期待できる。

これらのメリットから、欧米ではLLNA法による感作性試験・研究が広く行われ、データが蓄積され、ICCVAMでの評価を経て、OECDガイドラインとして受け入れられた。EPA, FDA, OSHAも受け入れている。

しかし、リンパ節の細胞増殖反応の検出に放射性同位元素(RI)標識化合物のDNAへの取り込みを指標として用いていることや、RIをマウスに尾静脈投与するという手技上の問題があり、わが国での普及が妨げられている。RIを用いない改良法としてBrdUの取り込みやIL-2産生を検出する方法が報告されているが、十分にバリデートされていなかった。

## C-2) 申請法について

### C-2-1) LLNA-BrdU法の原理

皮膚感作性は経皮的に取り込まれた低分子化学物質(ハプテン)が生体のタンパクと結合して感作原となることにより起こると考えられている。感作誘導期ではタンパクと結合したハプテンがランゲルハンス細胞に取り込まれ、活性化されたランゲルハンス細胞が所属リンパ節に遊走し、T-リンパ球に抗原提示を行う。抗原提示を受けたT-リンパ球は特異抗原を認識したT-リンパ球として増殖する。

LLNA法はマウス耳介から吸収された被験物質(ハプテン)による抗原特異的T-リンパ球の増殖を、耳介リンパ節(標的臓器)におけるRI標識化合物( $^3\text{H}$ -Methyl thymidine)の核酸成分への取り込みを指標として検出する方法である。一方、申請されたLLNA-BrdU法は細胞増殖を検出する指標をBrdUのDNAへの取り込み量に変更したものであり、基本的な原理はLLNA法と変わらないと考えられる。

なお、LLNA-BrdU法は感作誘導についてはLLNA原法と同一であるが、BrdUを腹腔内投与し、リンパ球増殖の指標としてのBrdUの取り込み量をELISAで測定するところがLLNA原法と異なっている。結果の解析手法としてLLNA法は $^3\text{H}$ -Methyl thymidineの取り込みが3倍以上となることを、陽性と判断するエンドポイントとしているが、提案されたLLNA-BrdU法ではいくつかの指標について、記載されており、それらの妥当性が評価委員会で特に審議した点である。

### C-2-2) LLNA-BrdU法のプロトコール

LLNA-BrdU法のプロトコールを以下に要約する。

使用動物：未妊娠、未経産の8-12週令の雌性CBA/JNマウス(日本チャールス・リバー株式会社)を用いる。

なお、CBA/JNマウスは、感作性物質として知られている

p

-Benzoquinoneに対する応答性が免疫学実験に汎用されているBALB/cAnNおよびClosed colonyのCD-1と比較し、応答性が高いことが、提案者により確認されている。

投与群設定：陰性対照群(媒体対照群)と陽性対照群を設ける。最低1群5匹で3用量の被験物質群を設ける。

用量は0.1%、1%、10%、50%などから選び、毒性や刺激性を避けた最大濃度を最大用量とする。なお、陽性対照群としては、 $\alpha$ -Hexylcinnamic aldehyde (HCA)やIsoeugenol、2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)などを用いる。

群あたり動物数：1群あたり5匹以上

溶媒：一般的に使われるものはアセトン・オリーブ油混液(v/v = 4:1、A00)であるが、他にN,N-Dimethylformamide (DMF)、Methyl ethyl ketone (MEK)、Propylene glycol (PG)、Dimethylsulfoxide (DMSO)なども使用することができる。

試験操作：

#### 1) 感 作

毎日ほぼ一定の時刻に、マウスの両耳介にマイクロピペッターなどを用いて1耳介当たり25  $\mu\text{L}$ を塗布



する。感作は初日を Day 0 として Day 2 までの 3 日間連続塗布する。

## 2) BrdU の投与

最終感作の 2 日後 (Day 4) に BrdU 生理食塩液溶液 (10mg/ml) を 1 匹当たり 0.5 ml 腹腔内投与する。

## 3) リンパ節の採取

BrdU 投与の 24 時間後 (Day 5) に動物を安楽死させた後、頸部を切開し耳の直下にある耳介リンパ節を採取する。採取したリンパ節は直ぐに測定しない場合は -20°C 以下で保存可能であり、採材日以降に解凍して測定に供することも出来る。

## 4) BrdU 取り込み量の測定

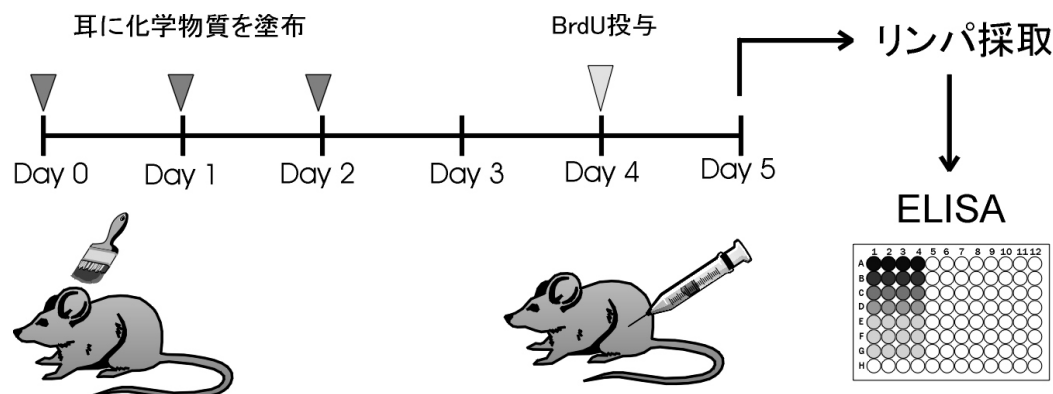
耳介リンパ節を 1 匹分毎にマイクロチューブ内で少量の生理食塩液と共にすりつぶし、ナイロンメッシュ (No. 70) で濾過した後、最終的に 15 mL の生理食塩液に分散する。この細胞分散液の 0.1 mL をマイクロプレートに移し BrdU 取り込み量の測定に供する。測定には市販の BrdU 測定キット (Roche Applied Science 社製の Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric kit, Cat. No. 11647229001) を用いる。

結果の判定：

対照群 (媒体のみ投与) の BrdU 取り込み量に対して化学物質を投与した群の取り込み量の比、Stimulation index (SI) を求め、各用量群の平均値、標準偏差および標準誤差を算出する。対照群の平均値+3SD を cutoff 値としてそれを超える場合を陽性と判定する。また、対照群と処置群の間で統計的手法 (Dunnett test, Unpaired t-test など) を用いて有意差が認められる場合を陽性としてもよい。

実施方法の概略を図 1 に示す。

図 1 Non-RI LLNA の概略



### C-2-3) LLNA-BrdU 法の特徴

LLNA 法と比較し、LLNA-BrdU 法の特徴は以下のように要約される。

- 1) LLNA 法はリンパ細胞増殖の指標として  $^3\text{H}$ -Methyl thymidine の DNA への取り込みを測定するが LLNA-BrdU 法では RI を使用しない方法として、BrdU の取り込み量の増加を指標としたものであり、原理的に LLNA 法に極めて近い。
- 2) 被験物質の投与方法、スケジュールは LLNA 原法と同一である。すなわち、3 日間連続投与により感作誘導を行い、6 日目のリンパ球増殖を測定する。
- 3) 再現性については、データを単純に比較することができないため明確に述べることはできないが、提案者の施設で行われた 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)、Isoeugenol、 $\alpha$ -Hexylcinnamic aldehyde (HCA) の 3 物質を用いた 3 回の繰り返し実験の結果を見ると、報告されている LLNA 法のデータと比較して劣ることはないようであり、概ね同等もしくは良いと推察された。
- 4) 感作性物質の識別性はどの cutoff 値をとるかによって異なる。提案者は当初、判定基準を「対照群の平均値+3SD を cutoff 値としてそれを超える場合を陽性と判定する。また、対照群と処置群の間で統計的手法を用いて有意差が認められる場合を陽性としてもよい。」としていたが、評価委員会の提示した「統計学的有意差が認められ、しかも SI 値がある一定基準値を超える場合を陽性とするような組み合わせによる判定基準にすべき」との意見に基づいて検討し、「統計処理により陰性対照と有意差を有し、且つ SI 値が 1.5 以上を示すものを陽性とする場合および陰性対照の平均+3SD を基準としてそれを超え、且つ SI 値が 1.5 以上を示すものを陽性とする」場合に False positive を最小、且つ一致率の最も高い結果が得られるという知見を得た。この時の一致率はカッパー係数で 0.8 を上回り、LLNA-BrdU 法は LLNA 法とほぼ一致する結

果を示した。

5) RI 標識化合物を静脈内投与しないことから実験操作や廃棄物処理が容易である。

#### C-2-4) 提案書に記載されたバリデーシヨンの種類

提案者の施設で実施された試験で LLNA-BrdU 法のバリデーシヨンが行われ、再現性や識別性を検討し、LLNA 法と比較した。また、提案施設以外にも石原産業、日本新薬（株）および富士写真フィルム（株）において検討されたが、多施設バリデーシヨンとしては被験物質が少ないこと、また、コード化した被験物質が配布されていないことから、OECD(1996)が示した適切な多施設バリデーシヨンの基準を満たしているとは言えないと考えられた。提案法について、公平な評価を行う上では更に多施設バリデーシヨンの結果が必要である。

#### C-3) 提案者の行ったバリデーシヨンの結果について

##### C-3-1) 被験物質の妥当性

被験物質は 23 種類で、その内 LLNA 原法で陽性と判定されているものが 15 種類、陰性と判定されているものが 8 種類であった。

被験物質には、クロルベンゼン類 (DNCB: 2,4-Dinitrochlorobenzene, p-Chloroaniline)、芳香族アミン類 (pPDA: 4-Phenylenediamine, Aniline, p-Chloroaniline)、フェノール類 (Isoeugenol, Eugenol, m-Aminophenol)、キノン類 (p-Benzoquinone)、ケトン類 (Diphenylcyclopropenone)、アルデヒド類 (Glutaraldehyde, Cinnamic aldehyde, HCA:  $\alpha$ -Hexylcinnamic aldehyde, Citral, 3-(4-Isopropylphenyl)isobutyraldehyde, Hydroxycitronellal)、アルコール類 (Isopropanol, Glycerol, Propylene glycol)、チオール類 (MBT: 2-Mercaptobenzothiazol)、エステル類 (Isopropyl myristate, Phthalic acid diethyl ester, Dimethylisophthalate, 2-Hydroxypropylmethacrylate)、酸化・還元剤 (p-Benzoquinone, Diphenylcyclopropenone) など、様々な種類の化学物質が含まれていた。しかしながら、LLNA 法で偽陰性となりやすいと思われる金属塩類 ( $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiSO}_4$ ) は含まれていなかった。また、殺菌剤 (Propylparaben など)、界面活性剤 (Benzalkonium chloride など)、カルボン酸 (Trimelitic anhydride, Abietic acid など)、Urea 類 (Imidazolidinyl urea など) も含まれていなかった。

感作性の程度に関しては、強い感作性物質である DNCB, p-Benzoquinone, pPDA, Diphenylcyclopropenone, Glutaraldehyde、比較的強い感作性物質として MBT, Cinnamic aldehyde, Isoeugenol, m-Aminophenol、弱い感作性物質として Eugenol, HCA, Citral, 3-(4-Isopropylphenyl)isobutyraldehyde, Isoeugenol, Hydroxycitronellal、極めて弱い感作性物質として Isopropyl myristate、また、非感作性物質として 2-Hydroxypropylmethacrylate, Aniline, Glycerol, Isopropanol, p-Chloroaniline, Phthalic acid diethyl ester, Propylene glycol, Dimethylisophthalate が選択されている。

以上から、施設内バリデーシヨンでの被験物質の数と選択はほぼ適切であると考えられるが、今後行われるバリデーシヨンでは LLNA 法で金属塩や水溶性物質のように偽陰性となりやすい物質もいれておく必要がある。

##### C-3-2) *In vivo* データとの対応性

下の表に示したように、多くの物質について LLNA-BrdU 法は LLNA 法と同じ結果が得られた。LLNA-BrdU 法と LLNA 法との間の判定の一致率は識別値を 95%信頼区間 (CI) とした時は 83%、3 標準偏差 (SD) とした時は 91%、SI 値 3 以上とした時は 87%、SI 値 2 以上とした時は 87%であった。

なお、MBT の結果が SI3 あるいは SI2 を識別値とした時、陰性であったが、Basketter ら (1992) や De Jong ら (2002) による LLNA の報告では陽性であり、OECD ガイドライン 429 では、MBT を陽性対照物質として推奨している。なお、LLNA-DA 法では 10% で SI 値が 2.0 と有意な増加は見られるものの、3 を超えず陰性とされた。それ以上の濃度では逆に SI 値が低下している。LLNA 法の場合と異なり、LLNA-BrdU 法で SI 値が低くなる理由は今のところ不明であるが、RI 測定と抗 BrdU 抗体による ELISA 測定のダイナミックレンジの違いや BrdU は元々 DNA 合成の内因性基質ではないことからその取り込み速度が Thymidine に比べて遅いのではないかとの議論がなされた。また、LLNA 法と同様に LLNA-DA 法も金属塩類の検出感度は良くないが、LLNA-BrdU 法では検討されていなかった。

表：23 検体の判定結果のまとめおよび他の試験結果との比較

物質名	感作性 強度	LLNA	LLNA -BrdU 95% CI	LLNA -BrdU 3SD	LLNA -BrdU SI 3	LLNA -BrdU SI 2	LLNA -DA
2,4-Dinitrochlorobenzene	+++	+	+	+	+	+	+
p-Benzoquinone	+++	+	+	+	+	+	
Diphenylcyclopropenone	+++	+	+	+	+	+	

Glutaraldehyde	+++	+	+	+	+	+	
4-Phenylenediamine	+++	+	+	+	+	+	+
2-Mercaptobenzothiazole	++	+	+	+	-	-	-
Cinnamic aldehyde	++	+	+	+	+	+	+
Isoeugenol	++	+	+	+	-	+	+
m-Aminophenol	++	+	+	+	+	+	
3-(4-Isopropylphenyl)isobutyraldehyde	+	+	+	+	-	-	
Citral	+	+	+	+	+	+	+
Eugenol	+	+	+	+	+	+	+
Hydroxycitronellal	+	+	+	-	-	-	
$\alpha$ -Hexylcinnamic aldehyde	+	+	+	+	+	+	+
Isopropylmyristate	+/-	+	+	+	+	+	
2-Hydroxypropylmethacrylate	-	-	-	-	-	-	
Aniline	-	-	+	-	-	-	
Glycerol	-	-	+	-	-	-	
Isopropanol	-	-	-	-	-	-	
p-Chloroaniline	-	-	+	+	-	+	
Phthalic acid diethyl ester	-	-	-	-	-	-	
Propylene glycol	-	-	-	-	-	-	
Dimethyl isophthalate	-	-	+	-	-	-	-

LLNA: Local lymph node assay, LLNA-BrdU: LLNA modified by Takeyoshi, LLNA-DA: LLNA modified by Daisel Kagaku.

95% CI : 95% confident interval, 3SD: SD\*3, SI3: Stimulation Index 3, SI2: Stimulation index 2,

### C-3-3) データの信頼性

提案者はアレルギー試験について平成元年より経験がある。また、LLNA-BrdU 法は提案者が独自に開発したものである。その成果は 6 報の原著論文および総説にまとめられており、十分な技術蓄積があるものと思われる。方法自体も尾静脈でなく腹腔内投与を採用し、さらに ELISA 法での BrdU 取り込み量の測定は市販のキットを用いるなど技術面で困難と思われる所は認められない。また、提案者の属する安全性試験施設は GLP 認定施設であり、GLP 試験に準じた試験操作に習熟しており、特に問題は無いと思われた。従って、技術面でデータの信頼性はある程度高いと考えられる。後で述べるように、プロトコールに関しては若干の修正があったが、データの信頼性に関わるものでは無かった。全体として具体的かつ丁寧に記述されており、施設内バリデーションの結果も適切にまとめられていた。個別データも提出され、施設内バリデーション結果を確認できた。

提案者以外の施設における試験の信頼性についての情報は無かったが、個別データは提出されており、確認できた。しかし、OECD のバリデーション基準からみると不十分であり、多施設バリデーションはコード化された被験物質を用いて実施し、データの信頼性を更に確認する必要がある。

なお、Back ground data の高い事例が幾分見られたが、酵素基質を入れてからの時間など、測定操作の詳細を定め、明示する必要があると思われる。

### C-3-4) 施設内再現性

LLNA 法の再現性に関し、Basketter ら(2004)はヒトに対して中等度の感作性を有する Isoeugenol を 0.5, 1.0, 5%の用量で LLNA 実験を 29 回繰り返したデータを報告している。それによると、0.5%における SI 値の最小値は 0.7、最大値は 2.3、変動係数は 28%、1%における SI 値の最小値は 1.00、最大値は 6.3、変動係数は 53%、5%における SI 値の最小値は 4.9、最大値は 31.0、変動係数は 49%であった。また、Dearman らはヒトにおいて軽度の感作性を有する  $\alpha$ -Hexylcinnamic aldehyde (HCA) を 2.5, 5, 10, 25, 50%の用量で 5 回繰り返したデータを報告している。それによると 2.5%における SI 値の最小値は 1.02、最大値は 2.23、変動係数は 28%、5%における SI 値の最小値は 1.36、最大値は 3.19、変動係数は 30%、10%における SI 値の最小値は 1.97、最大値は 7.07、変動係数は 57%、25%における SI 値の最小値は 7.15%、最大値は 13.88%、変動係数は 30%、50%における SI 値の最小値は 11.63%、最大値は 17.58%、変動係数は 15%であった。

LLNA-BrdU 法の再現性については、提案者は陽性対照物質である 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)、Isoeugenol、 $\alpha$ -Hexylcinnamaldehyde (HCA) の 3 物質の繰り返し実験を行った。DNCB では 3 回繰り返し実験の結果、いずれも SI 値は 3 を上回り、陰性対照群の SI 値+3SD を基準とした判定で全て陽性と判定された。

なお、3回繰り返し実験の平均SI値は15.2であり、その変動係数は16.8%であった。Isoeugenolでは3回繰り返し実験の結果、いずれもSI値は3を上回り、陰性対照群のSI値+3SDを基準とした判定で全て陽性と判定された。なお、3回繰り返し実験の平均SI値は8.02であり、その変動係数は28.0%であった。HCAでは媒体としてAcetone/olive oil (A00)またはMethylethylketone (MEK)の2種類の媒体を用いてそれぞれ5回繰り返し実験を行った。その結果、いずれの媒体を用いた場合もSI値は3を上回り、陰性対照群のSI値+3SDを基準とした判定で全て陽性と判定された。なお、5回繰り返し実験の平均SI値はA00で6.10、MEK6.21であり、変動係数はA00の場合36.6%、MEKの場合で33.9%であった。

再現性については、両者のデータを単純に比較することができないため明確に述べることはできないが、提案者の施設で行われた3物質を用いた3回の繰り返し実験の結果を見ると、報告されているLLNA法のデータと比較して劣ることはないようであり、概ね同等もしくは良いと推察された。

ただし、当初の提案から判定基準を修正する方向であるため、新たに設定し直した基準に基づく結果の再現性も確認する必要がある。

#### C-3-5) 施設間再現性

提案施設以外に、石原産業において6陽性物質、日本新薬(株)において3陽性物質、富士写真フィルム(株)において3陽性物質が検討され、SDの3倍を超える場合に陽性と判定する方法では、いずれも陽性の結果が得られた。これらの被験物質には強い感作性から弱いものまで含まれており、それらがいずれも陽性と判定されたことは、判定において施設間の再現性は良いと思われた。しかし、非感作性物質については検討されていない。今後行われる多施設バリデーションにおいては、非感作性物質についての再現性も検討する必要がある。また、当初の提案から判定基準を修正する方向であるため、新たに設定し直した基準に基づく結果の再現性を確認する必要がある。

留意すべき結果としては、石原産業での媒体対照群の吸光度値が他施設に比べてコンスタントに高値を示している。酵素基質を入れてからの時間やELISA操作における洗いや染色操作に個人差などの問題が考えられるが、原因を明らかにし、媒体対照群の吸光度値を適正なものにする必要があると思われる。

#### C-3-6) 比較対照とした *in vivo* データの妥当性

申請書の5項で示された被験物質の *in vivo* データは、別記したものを除き、Gerberickら(2004)およびBasketterら(2000)の論文に記載されたLLNAデータから引用したものである。一方、7項では *in vivo* データとの対応性をLLNA法の論文に記載された結果との比較で考察しているが、LLNA-BrdU法はLLNA法の代替法であるので、既存のLLNA法データと比較することは妥当であると考えられる。しかし、LLNA法の最終目的はヒトの感作性を予測することであるので、Hanekeら(2001)の論文に示されたヒトでの感作性の有無やBasketterら(2002)の論文などに示されたヒトでの感作性強度との対応性についても、比較検討することが望ましいと思われる。

GPMTとの対応性についても、Eugenolとその2量体の場合を除き、検討されていない。得られたデータに対して多面的な考察をしていくために必要となるので、あらかじめ可能な限りデータを収集し、被験物質を選択する時にも留意することが望ましいと思われる。

#### C-3-7) 試験法の頑健性

OECD TG429を始め、これまでに承認されたガイドラインおよびICCVAMによるLLNA法バリデーション報告書においてマウスの系統選択に関してはCBA/Caマウス或いはCBA/Jマウスが推奨系統として記載されている。我が国ではCBA/J系のマウスとして入手可能なものはCBA/JNCrj(日本チャールスリバー)のみである。そこで国内で入手可能なマウスとしてCBA/JN、BALB/c、CD-1(いずれも日本チャールスリバー)を用いて、ヒトに対してアレルギー性を有するp-Benzoquinoneに対する応答性を比較した。その結果、いずれの系統も用量依存的にSI値の上昇が認められたが、最低濃度の0.25%でSI値が3を超えた系統はCBA/JNであり、CD-1は最高濃度の1%でもSI値は3に達しなかった。これらの3系統の応答性に関して用量および系統をFactorとしてTwo-way ANOVAによる解析を実施した結果、CBA/JNが最も応答性が良いことが確認された。また、p-Benzoquinoneを用いた検討で、CD-1と他の2近交系系統の間には交互作用が認められた。

このように、マウスは系統によって感作性物質に対する反応が異なることから、適切な系統のマウスを用いるとともに、常に陰性および陽性対照を用い、その反応性を確認することが必要である。このように実施する限りにおいて、動物の系統差やロット差による変動をカバーでき、頑健な方法であると思われた。

一方、BrdU測定については測定キットを使用することから、操作による変動は問題ないと考えがちであるが、キット付属のマニュアルにも幾通りかの操作方法が記載されている(例えば、遠心後の上清の除去、プレートの乾燥法、二次抗体の反応時間)など、測定値が変動する要因があると思われる。このため、操作の自由度を示した詳細なプロトコルが必要であり、適正なプロトコルで測定を制御するならば頑健な方法となると思われた。

#### C-3-8) 動物福祉面からの妥当性

LLNA-BrdU 法は *in vivo* 試験法であり、完全な代替試験法ではない。しかし、LLNA 法と同様に FCA 処置を行わず、また感作成立後に抗原を投与し、抗原・抗体反応を惹起させるステップが無いことから、GPMT などの他の感作性試験と比較して動物に与えるストレスが少ない。使用動物数は LLNA 法が 1 群 5 匹以上（個体別のデータを取得する場合）であるが、LLNA-BrdU 法も同様に 1 群 5 匹以上である。GPMT 法も医薬品毒性試験法ガイドラインにおいて 1 群 5 匹以上が要求されている。これらのことから、LLNA-BrdU 法は LLNA 法と同等であり、GPMT よりも優れているところがあると考えられる。

#### C-3-9) LLNA-DA 法との比較

LLNA-BrdU 法は LLNA 原法と同じく、リンパ球の増殖を測定指標にしている。動物への適用方法は LLNA 原法と同様であり、異なる所はリンパ球の増殖の測定法を RI を使用しないように変更した点だけである。LLNA-DA 法において感度を上げるために行われる被験物質投与前の 1%SLS 処置や被験物質の追加投与を実施しないために、感作誘導については LLNA-DA 法よりも LLNA 原法に近いと考えられる。

一方、リンパ球の増殖の測定部分について見ると、LLNA-DA 法では ATP 含量の変化を測定しており、試料調製後、ATP 測定が短時間でできるが、逆に直ちに測定しなければならないという制約がある。LLNA-BrdU 法では BrdU の取り込み量の測定は ATP 量よりも操作行程が多くて煩雑であるが、実験を短時間で実施しなければならないという制約はない。ただし、得られる SI 値は LLNA 原法および LLNA-DA 法に比べて低値になるため、新たな判断基準を設ける必要がある。

#### C-3-10) コストからの妥当性

コストの面については詳しい積算は示されていないが、RI を使用する LLNA 原法に比べて、特にコストパフォーマンスが悪いとは思われない。LLNA 法は RI 施設とシンチレーションカウンターという高価な機器が必要であるが、LLNA-BrdU 法では RI 施設は必要なく、測定機器は通常のマイクロプレートリーダーなので、通常の実験施設であれば改めて機器を購入する必要はない。ELISA において、1 匹当たり 3 穴、1 群 5 匹とすると  $3 \times 5 = 15$  穴、試験用量を 3 段階とすると媒体対照群を含めて  $15 \times 4 = 60$  穴。ブランク穴を含めると、1 物質を評価するのに 63 穴程度は必要であろう。ELISA キットの値段は 1000 穴分で 72800 円である。

#### C-3-11) その他の面からの考察

RI 標識化合物を用いないこと、また、廃棄物処理の手間がかからないという利点があることから、広く日本の安全性試験で利用されることが期待される。

LLNA-DA 法と比較すると操作に時間がかかると思われる。

LLNA 法は Maximization 法で実施できる交差反応性の検討を行うことができないという欠点があるが、LLNA-DA 法や LLNA-BrdU 法も同様である。

試験はかならず、休日出勤が必要となる。

#### C-3-12) その他申請者への質問事項

- 1) 他施設の実験成績のところ、富士フィルムの媒体は具体的に何かを、可能なら、示してもらいたい。
- 2) p-Chloroaniline の 50%A00 溶液をマウスの耳に塗布した時、皮膚刺激反応は認められたかどうかを示してもらいたい。すなわち、用量反応関係がないのは皮膚刺激によるものか否かを確認させていただきたい。
- 3) LLNA-BrdU 法の将来的な普及という観点で、「0、1、2 日に感作処置を行い、4 または 5 日に BrdU を投与し、5 または 6 日目にリンパ節を採取」という方法にできないかという意見に対して、可能であれば、この方法の採用に関する可否を科学的に示していただきたい。（休日出勤をしないですむなら、その方が望ましいということがある）

#### C-4) 評価委員会で特に審議した点

##### C-4-1) LLNA-BrdU 法開発コンセプトの妥当性について

従来の LLNA 法は、リンパ球の増殖反応を測定するために  $^3\text{H}$ -Methyl thymidine などの放射性物質 (RI) を使用している。RI の使用は特殊な実験施設を必要とし、放射能汚染、廃棄物の処理の問題など、試験を実施する上で種々の制約をもたらす。本法は従来法の欠点を取り除くために、 $^3\text{H}$ -Methyl thymidine などの代わりに BrdU を用い、リンパ節細胞の増殖反応を酵素免疫測定法 (ELISA) によって検出する「RI を使用しない LLNA 法」として開発された。感作誘導法は LLNA 法と同一であり、一方でリンパ節細胞の増殖測定における非 RI 化という有用な改良がなされたことから、LLNA の代替法として妥当と考えた。RI 施設を有しない機関でも実施でき、さらに吸光度により測定するため、比較的一般的機器によって試験を実施できるという点で優れていると考えられた。

#### C-4-2) 被験物質の適用範囲の妥当性について

本法が適用できる被験物質の範囲については LLNA 法と同様と考えられた。

#### C-4-3) 試験法についてのプロトコルの記載について

試験法自体は LLNA 法と比べて複雑なものではなく、申請されたプロトコルで概ね理解可能であると考えられた。BrdU 測定は通常の市販測定キットを使用することから、問題はないと考えられる一方で、ばらつき（測定値への影響）を懸念する指摘も認められた判定基準については当初のものから評価委員会の意見に基づいて修正された。

操作手順の細部に関し、以下の指摘があった。

- 4.5.1. の感作手順の 1) 「保定者は、人差し指と薬指で尾をはさみ、親指と人差し指で頭部を保定し、耳介を広げて保定する」の記述のうち、人差し指と薬指は小指と薬指の誤りである。
- 動物への感作に 2 人（保者と実験者）で行うようになっているが、1 人でも適用可能である。
- リンパ節をつぶす操作で、ペレットペッスルを使用するようになっているが、より一般的に機械的にメッシュを用いてつぶすなどの操作や表現でも良い。
- ELISA で発色した後、吸光度は時間とともに分単位で速やかに増加するので、時間を決めて反応停止液を加えた方がよい。
- 4.8.4 の測定準備および測定 10) Washing 操作法は提案されたプロトコルから逸脱しない範囲内において実験者ごとに操作の差が生じやすいので詳細に記述した方が望ましい。
- BrdU 測定については、基本的にはキットを使用するので、大きな問題はないと思いがちである。しかし、キット付属のマニュアルにも幾通りかの操作方法が記載されている部分がある（遠心後の上清の除去、プレートの乾燥法、二次抗体の反応時間など）ので、どの程度まで自由度があるのかを示す必要がある。
- 反応停止液を使用した場合と使用しない場合で差がないかどうかを示す必要がある。リンパ節を凍結保存して後日測定できるとあるが、具体的な保存温度、期限を示す必要がある。
- 判定基準において SD の 2 倍あるいは 3 倍をとっていることから、その程度を見やすくするため、申請書の表に示された SE は SD に直すか、SD の項を追加する方が望ましい。
- 判定基準を変更した場合、結果の記録用紙も変更する必要がある。

#### C-4-4) 必要な機器、器具、器材についてのプロトコルの記載について

以下のような指摘があった。

- 4.8.4 測定準備および測定 11) において、TMB 発色基質を入れてからの時間は、15min と限定せず、5-30min とした方が良いと思われる。また、TMB による発色は、酸性の反応停止液を入れてから、450nm で測定の方が一般的と思われるので、13) として、反応停止液の組成、加える容量も明記した方が良いと思われる。
- 4.8.4 測定準備および測定 5) において、Fix Denat が BrdU ELISA キットに含まれているのであればその旨を記載するのが望ましい。
- マイクロプレートリーダーで適正に測定できることが確認されている機種例を示してほしい。（過去のバリデーション研究でマイクロプレートリーダーの機種が異なることが試験データのばらつきにつながったことがある。）
- 4.8.3 に使用する器具について、具体的な容量や材質あるいは一般名を記載してほしい。例えば、カップとは？ペレットペッスルとは？チューブの材質や容量、用いるディスプレイピペットの容量、及びナイロンメッシュの孔径とその取り付け方など。
- BrdU 測定キットは 1 種類に限定されるか、あるいは、他にも使用可能なキットがあるかどうかを示す必要がある。

#### C-4-5) 被験物質の用量について

LLNA 原法と被験物質の濃度や媒体が異なる場合には比較が困難となることから、基本的に LLNA 原法に準じるのが良いと考えられた。その際、設定された濃度において媒体に溶解しない時の濃度設定処置について考慮しておくべきである。なお、被験物質の用量は溶解性だけでなく皮膚刺激性（場合によっては単回投与毒性）も考慮して設定すべきと思われる。

#### C-4-6) LLNA-BrdU 法のプロトコルの問題点について

LLNA-BrdU 法のプロトコル上の問題点について、特に検討されたところを以下に示す。

##### 1) 判定基準について

概ねプロトコールは妥当であるとされたが、判定基準についていくつかの方法が記載されており、最終的にどれを、あるいはどの組み合わせを採用するのか、提案者の考えを明確に示すべきと思われた。

陰性対照群との統計的有意差の有無や陰性対照群の平均と 3SD 離れた場合を陽性と判定するという方法は、試験実施者の技能や実験条件に左右されるデータのバラツキにより、判定が左右され、技能の高い施設では false positive となる可能性が高くなり、技能の低い施設では false negative となる可能性が高くなるという、根本的な矛盾につながる問題があると指摘された。

#### 対照群でのデータのバラツキ

対照群のデータを求めた試験 における被験物質名	平均 OD (4 例)	平均	SE*	SD*	95%CL*
2,4-Dinitrochlorobenzene	0.247	1	0.29	0.58	1.91
p-Benzoquinone	0.098	1	0.11	0.22	1.35
Diphencyclopropenone	0.095	1	0.06	0.12	1.19
Diphencyclopropenone 2	0.069	1	0.04	0.09	1.14
Glutaraldehyde	0.095	1	0.06	0.12	1.19
Glutaraldehyde	0.070	1	0.2	0.4	1.63
p-Phenylenediamine	0.073	1	0.06	0.12	1.19
p-Phenylenediamine	0.070	1	0.2	0.4	1.63
2-Mercaptobenzothiazole	0.153	1	0.08	0.15	1.24
cinnamic aldehyde	0.157	1	0.08	0.15	1.25
Isoeugenol	0.452	1	0.12	0.24	1.39
m-Aminophenol	0.095	1	0.11	0.22	1.35
3-(4-Isopropylphenyl)isobutyraldehyde	0.115	1	0.08	0.15	1.25
Citral	0.070	1	0.2	0.4	1.63
Citral	0.066	1	0.11	0.23	1.37
Eugenol	0.048	1	0.23	0.46	1.73
Hydroxycitronellal	0.145	1	0.08	0.15	1.25
$\alpha$ -Hexylcinnamic aldehyde	0.157	1	0.08	0.15	1.25
Isopropyl myristate	0.077	1	0.21	0.43	1.69
Isopropyl myristate	0.069	1	0.04	0.09	1.14
2-Hydroxypropylmethacrylate	0.106	1	0.07	0.14	1.22
Aniline	0.095	1	0.11	0.22	1.35
Glycerol	0.059	1	0.06	0.13	1.2
Isopropanol	0.123	1	0.13	0.26	1.42
p-Chloroaniline	0.095	1	0.11	0.22	1.35
Phthalic acid diethyl ester	0.106	1	0.07	0.14	1.22
Propylene glycol	0.226	1	0.23	0.46	1.74
Dimethyl isophthalate	0.106	1	0.07	0.14	1.22
平均	0.119				
SD	0.081				
SE	0.015				

メモ

\*: SD, SE, 95%CL 対照群の値の平均を 1 としたときの換算値。

28 の対照群のうち、95%信頼限界が 1.5 以上の実験が 5 回あった。

対照群の ELISA の値の最高値と最低値の間で 9.4 倍の差があった。

LLNA原法と同じSI値を指標に取り入れ、感度が低いことを考慮してSI値1.5を判定基準とする案についても検討したが、媒体対照を用いた試験群内の動物間のばらつきを見ると、上の表に示したようにSI値が1.5程度の差が頻繁に認められていることもあり、SI値単独での基準設定は困難であるように思えた。このような判定

基準についての問題に対し評価委員会は統計学的有意差が認められ、しかもSIがある一定の基準値を超える場合を陽性とするような組み合わせによる判定基準の設定へ改良案を提示した。下の表は提案者がこの考え方に基づいて、判定した結果を示したものである。これによれば、 $SI \geq 1.5$ という条件をつけ、さらに対照群との統計的有意差がある場合、およびSIが3SD以上であるとした場合、いずれも偽陰性率は6.7%であり、カッパ係数は0.808と最も大きい値を示した。一方、 $SI \geq 2, 0$ という条件をつけた場合は、False negativeが20.0%と大きくなった。

SI $\geq 1.5$ であること各種エンドポイントを組み合わせた場合の識別性

	Statistics*1	$\geq 95\%$ C. I. *2	$\geq 2SD$ *3	$\geq 3SD$ *3	SI $\geq 3$ *4	SI $\geq 2.5$ *4	SI $\geq 2$ *4	SI $\geq 1.5$ *4
Concordance	91.3	87.0	87.0	91.3	82.6	78.3	87.0	87.0
Negative Predictivity	87.5	85.7	85.7	87.5	66.7	63.6	77.8	85.7
Positive Predictivity	93.3	87.5	87.5	93.3	100.0	91.7	92.9	87.5
Prevalence	65.2	65.2	65.2	65.2	65.2	65.2	65.2	65.2
Sensitivity	93.3	93.3	93.3	93.3	73.3	73.3	86.7	93.3
Specificity	87.5	75.0	75.0	87.5	100.0	87.5	87.5	75.0
False positive rate	12.5	25.0	25.0	12.5	0.0	12.5	12.5	25.0
False negative rate	6.7	6.7	6.7	6.7	26.7	26.7	13.3	6.7
kappa coefficient	0.808	0.704	0.704	0.808	0.657	0.559	0.559	0.704

\*1: SI $>1.5$ であり、且つ対照群のSI値と被験物質群のSI値とが統計学的に有意差がある時に陽性と判定

\*2: SI $>1.5$ であり、且つ被験物質のSI値の平均値が対照群の95%信頼限界の外にある時に陽性と判定

\*3: SI $>1.5$ であり、且つ被験物質のSI値の平均値が対照群の標準偏差の2倍あるいは3倍以上であるときに陽性と判定

\*4: 被験物質のSI値の平均値が対照群の値の平均値の3, 2.5, 2, あるいは1.5倍以上であるときに陽性と判定

これらの結果から、最終的な判定基準については、SI値と統計的手法の組み合わせによる判定とすることに加え、**提案者により**対照群の95%信頼限界が1.5以上となる例が頻繁に認められることが示されたことを考慮し、**対照群の95%信頼限界が平均値比で1.5以下の時に試験が成立するとし、被験物質群のSI値が1.5以上でかつ統計的有意差が認められるときに陽性と判定することが適当であると考えられた。**

SI $\geq 2$ であること各種エンドポイントを組み合わせた場合の識別性

	Statistics*1	$\geq 95\%$ C. I. *2	$\geq 2SD$ *3	$\geq 3SD$ *3	SI $\geq 3$ *4	SI $\geq 2.5$ *4	SI $\geq 2$ *4
Concordance	82.6	82.6	82.6	82.6	82.6	78.3	87.0
Negative Predictivity	70.0	70.0	70.0	70.0	66.7	63.6	77.8
Positive Predictivity	92.3	92.3	92.3	92.3	100.0	91.7	92.9
Prevalence	65.2	65.2	65.2	65.2	65.2	65.2	65.2
Sensitivity	80.0	80.0	80.0	80.0	73.3	73.3	86.7
Specificity	87.5	87.5	87.5	87.5	100.0	87.5	87.5
False positive rate	12.5	12.5	12.5	12.5	0.0	12.5	12.5
False negative rate	20.0	20.0	20.0	20.0	26.7	26.7	13.3
kappa coefficient	0.617	0.617	0.617	0.617	0.617	0.520	0.617

\*1: SI $>2$ であり、且つ対照群のSI値と被験物質群のSI値とが統計学的に有意差がある時に陽性と判定

\*2: SI $>2$ であり、且つ被験物質のSI値の平均値が対照群の95%信頼限界の外にある時に陽性と判定

\*3: SI $>2$ であり、且つ被験物質のSI値の平均値が対照群の標準偏差の2倍あるいは3倍以上であるときに陽性と判定

\*4: 被験物質のSI値の平均値が対照群の値の平均値の3, 2.5, あるいは2倍以上であるときに陽性と判定

なお、結果は、陽性/陰性だけでなく、LLNA原法のEC3のように陽性反応を示す濃度域から感作原性の強さ(extreme, strong, moderate, weak, extremely weak)についても評価を加えることが、LLNA原法の代替法としては求められるので、これに関連した成績と考え方を申請資料に加えることが望ましいと考えられた。

## 2) 動物福祉面からの妥当性について

使用動物数はLLNA原法が1群5匹以上(個体別のデータを取得する場合)であるが、LLNA-Brdu法も同様



に1群5匹以上である。群数は3段階以上としており、これも原法と同様である。

LLNA-BrdU法はLLNA原法と同様に *in vivo* 試験法であり、完全な代替試験法ではない。しかし、GPMT法と比較した場合、LLNA原法と同様にFCA処置を行わず、また感作成立後に抗原を投与し、抗原・抗体反応を惹起させるステップが無いことから、動物に与えるストレスが少ないと思われる。

### 3) 対照物質について

LLNA法では陽性対照として使用されているHCAを使用しているが、その他、Isoeugenol, DNCBなども用いることができるとしている。陽性対照物質の種類と濃度の設定が必要である。LLNA-DA法の評価の際に、陽性対照はヒトに与える影響が大きいため、陽性対照を用いた試験の頻度を少なくしても良いのではないかとの意見もある。

### 4) 媒体について

媒体選択の順番については、プロトコールで特に言及されていない。施設間再現性を良くするためには媒体の選択における優先順位を示すべきと思われる。

### 5) ELISAを用いる方法の優位性について

リンパ節細胞数など他の指標と比較してELISA法を用いるという優位性について説明が必要である。

### 6) 感作性強度の分類基準について

今回申請書本文には、感作性陽性物質の強度に関する判定基準は記載されていない。これに関連した成績と考え方を申請資料に加える必要がある。

### 7) 刺激性物質と感作性物質の識別について

提案者の実施したバリデーションではLLNA法でfalse positiveとなることが知られている刺激性物質(例 Benzalkonium chloride, Sodium lauryl sulfate)が検討されていない。追加バリデーションを行う場合には、これらの物質についての評価を考慮する必要がある。

## C- 5) 特許の状況

今回のプロトコールについては、特許出願されていない。

## D. 現時点での総合評価

- 1) 評価委員会ではLLNA-BrdU法がC-2-3)で示したような特徴を有し、日本で使用しにくいRI標識化合物を用いない方法であること、施設内再現性が良いこと、また、原法であるLLNA法とほぼ同等の結果が得られていることから、LLNA法に置き換わりうる代替法であると思われる。
- 2) 感作性の有無の判断基準は「対照群の95%信頼限界が平均値比で1.5以下の時に試験が成立するとし、被験物質群のSI値が1.5以上でかつ統計的有意差が認められるときに陽性と判定する」ことが適当であると考えられた。
- 3) リンパ節細胞数を計測する方法と比較した時の優位性を確認した上で、バリデーションに進むか否かを判断すべきである。
- 4) 複数の施設でLLNA-BrdU法が検討され、その妥当性が示されているが、コード化された被験物質を用いていないことなど、OECD基準に則ったバリデーションではないことから、多施設バリデーションでより詳細なデータを得た上で更に評価する必要がある。
- 5) LLNA法では偽陰性を示す金属類や偽陽性を示す界面活性剤などが知られているが、LLNA-BrdU法ではそれらのデータが不足している。
- 6) 詳細なプロトコールが用意されているが、判定基準の修正に加え、BrdU測定についてさらに詳しく示す必要があるという指摘がある。今回の評価委員会の指摘を踏まえ、修正を行う必要がある。

## E. 今後行われる多施設バリデーションのあり方について

以下のように考えられた。

- 1) 評価委員の質問に適切な回答が行われた。この回答に沿ってプロトコールや判定基準が適正に変更されることを条件に、多施設バリデーションへの移行は問題ないとする。
- 2) 申請法は原理的に既にOECDで承認されたLLNA法とほとんど変わらないことから、バリデーションにおいては、LLNA法との類似性を示すための簡易バリデーションが良いと思われる。
- 3) Core laboratoryは化学物質評価研究機構に務めてもらい、プロトコールを作成してもらおう。また、技術トランスファーを実施してもらおう。

- 4) すでに技術移管の完了している4施設を中心に新規施設を2~3施設加えて、実施してみてもどうかという案がある。
- 5) バリデーションを行う施設はLLNA法の試験経験またはLLNA変法の研究経験を有する施設が良いと思う。
- 6) 評価方法として対照物質を用いる方法(相対的評価)をうまく取り入れた方が吸光度の数値を用いる場合よりも多施設バリデーションに向いているのではないかという意見を含め、検討する。
- 7) 試験期間を1ヶ月程度としたとき、1機関で実施可能な被験物質数はプロトコルの内容によって異なるが、陽性対照、陰性対照、被験物質2個(1用量)を1セットとした場合、1週間で実施可能であることから、これを3回繰り返すとして、6検体まで可能と思われる。
- 8) 用量段階は、LLNA法で用いられている濃度から3用量を選定するのが良いと思われる。
- 9) 被験物質候補リストは、提案者の協力を得て作成するのが良いと思われる。なお、LLNA法でfalse positiveとなることが知られている刺激性物質(例: Benzalkonium chloride, Sodium lauryl sulfate)についての評価も考慮する必要がある。
- 10) 初めはバイアスがなるべく少なくなるように、条件を揃えて実施するのが良い。

## F. 引用文献

- Basketter DA, Scholes EW (1992) Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. *Fd Chem. Toxicol.* 30, 65-69.
- Basketter DA, Gerberick GF, Kimber I, Loveless SE (1996) The local lymph node assay: a viable alternative to currently accepted skin sensitization tests. *Food Chem Toxicol.* 34, 985-97.
- Basketter DA, Evans P, Gerberick GF, Kimber I A (2002) Factors affecting thresholds in allergic contact dermatitis: safety and regulatory considerations. *Contact Dermatitis* 47, 1-6.
- Basketter DA, Cadby P. (2004) Reproducible prediction of contact allergenic potency using the local lymph node assay. *Contact Dermatitis.* 50, 15-7.
- De Jong WH, Tentij M, Spiekstra SW, Vandebriel RJ, Van Loveren H (2002) Determination of the sensitising activity of the rubber contact sensitizers TMTD, ZDMC, MBT and DEA in a modified local lymph node assay and the effect of sodium dodecyl sulfate pretreatment on local lymph node responses. *Toxicology*, 176, 123-134.
- Gerberick GF, Cruse LW, Miller CM, Sikorski EE, Ridder GM (1997) Selective modulation of T cell memory markers CD62L and CD44 on murine draining lymph node cells following allergen and irritant treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 146, 1-10, 1997.
- Gerberick GF, Ryan CA, Kern PS, Dearman RJ, Kimber I, Patlewicz GY, Basketter DA (2004) A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis*, 50, 274-288.
- Hariya T, Hatao M, Ichikawa H (1999) Development of a non-radioactive endpoint in a modified local lymph node assay. *Food Chem Toxicol.* 37, 87-93.
- Hatao M, Hariya T, Katsumura Y, Kato S (1995) A modification of the local lymph node assay for contact allergenicity screening: measurement of interleukin-2 as an alternative to radioisotope-dependent proliferation assay. *Toxicology* 98, 15-22.
- Kimber I, Mitchell JA, Griffin AC (1986) Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. *Food Chem Toxicol.* 24, 585-586.
- Kimber I, Basketter DA, Butler M, Gamer A, Garrigue JL, Gerberick GF, Newsome C, Steiling W, Vohr HW (2003) Classification of contact allergens according to potency: proposals. *Food Chem Toxicol*, 41, 1799-1809.
- OECD (1996) Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test methods; ENV/MC/CHEM/TG(96)9.
- OECD (2002) OECD guideline 429 Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, (adopted 24th April 2002)
- Takeyoshi M, Yamasaki K, Yakabe Y, Takatsuki M, Kimber I (2001) Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicol Lett.* 119, 203-8.
- Takeyoshi M, Sawaki M, Yamasaki K, Kimber I (2003) Assessment of statistic analysis in non-radioisotopic local lymph node assay (non-RI-LLNA) with alpha-hexylcinnamic aldehyde as an example. *Toxicology* 191, 259-63.
- Takeyoshi M, Sawaki M, Yamasaki K, Kimber I (2003) Assessment of statistic analysis in non-radioisotopic local lymph node assay (non-RI-LLNA) with alpha-hexylcinnamic aldehyde as an example. *Toxicology* 191, 259-63.

- Takeyoshi M, Noda S, Yamasaki K (2004) Differences in responsiveness of mouse strain against p-benzoquinone as assessed by non-radioisotopic murine local lymph node assay. *Exp Anim.* 53, 171-3.
- Takeyoshi M, Noda S, Yamazaki S, Kakishima H, Yamasaki K, Kimber I (2004) Assessment of the skin sensitization potency of eugenol and its dimers using a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J Appl Toxicol.* 24, 77-81.
- Takeyoshi M, Iida K, Shiraishi K, Hoshuyama S (2005) Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitizing potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J Appl Toxicol.* 25, 129-134.
- 医薬品非臨床試験研究会監修(2002), 医薬品非臨床試験ガイドライン解説 2002, 薬事日報社.
- 武吉正博 (2003) Murine Local lymph node assay (LLNA) の非 RI 化の試み、日本実験動物技術者協会 九州支部会報 No.27, pp1-5.

以上

(財) 化学物質評価研究機構より提案のあった  
皮膚感作性試験代替法 (LLNA-BrdU 法) の二次評価報告書

平成 21 年 2 月 26 日

日本動物実験代替法学会 評価委員会

委員長

大野泰雄 (国立医薬品食品衛生研究所)

副委員長

萩野滋延 (株式会社資生堂 リサーチセンター)

委員

高木弘毅 (サノフィ・アベンティス株式会社 統計解析室)

筒井尚久 (田辺三菱製薬株式会社 研究本部 安全性研究所)

手島玲子 (国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部)

オブザーバー

笛木 修 ( (独) 医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部)

\*: 一次評価の際の委員であった金澤由基子、五十嵐良明および牧栄二は今回の評価の対象  
となったバリデーションに参加したことから、二次評価には関与しなかった。

(財) 化学物質評価研究機構より提案のあった  
皮膚感作性試験代替法 (LLNA-BrdU 法) の二次評価報告書

要旨

平成16年度の厚生科学研究班(安全性評価のための動物実験代替法の開発および評価体制の確立に関する研究(H16-医薬-005)、主任研究者:大野泰雄)の決定により、(財)化学物質評価研究機構から提案のあった皮膚感作性試験 Local Lymph Node Assay (LLNA)の放射性同位元素(RI)標識化合物を用いない代替法(LLNA-BrdU法)の一次評価を行った。この方法は先に評価したATP含量の変化を指標とする方法(LLNA-DA法)と極めて類似していることから、評価委員会ではLLNA-DA法を評価するために組織した感作性試験評価ワーキンググループ(WG)で評価することとした。WGは申請者データに基づいて一次評価を行い、本試験法は原法であるLLNA法における<sup>3</sup>H-Methyl thymidineのDNAへの取り込みの代わりにBromodeoxyuridine (BrdU)取り込みを細胞増殖の指標にしたものであり、ほとんど同じ原理による方法であること、指標の増加率は若干原法より小さいが、ほとんど同一の識別能力を持つこと、RIを用いないこと、簡便であるといった利点があると判断した。しかし、行政試験法として評価する為には、更にデータの信頼性や施設間ばらつきについての情報を得る必要があることから、評価委員会からの指摘に対応し、実験手順書などを修正した後に、多施設バリデーションを実施するよう日本動物実験代替法学会バリデーション委員会に依頼した。同委員会は、このバリデーション研究を実施するために実行委員会(実行委員長:小島肇博士)を組織した。実行委員会では12物質(LLNA法の結果を参考に設定された3用量ずつ)を用い、9施設でバリデーションを実施した(第1実験)。しかしこの結果は、最終評価の指標となるSI値(stimulation index、被験物質群のBrdU取り込み量を溶媒対照群のBrdU取り込み量で除した数値)は施設ごとに大きくばらついていた。この原因として、溶媒対照群における吸光度が小さくなった場合、SI値の増大を招いてしまうことが考えられた。この第1実験の結果を受けて、実験が成立する吸光度の範囲を規定し、吸光度が下限未満とならないように細胞浮遊液の最終容量を事前に検討すると共に、上限を超える場合には、細胞浮遊液を希釈することにより規定範囲内に吸光度を収めれば、SI値のばらつきを小さくすることが可能であろうと考察した。この仮説は第1実験に参加した9施設による予備実験で検証され、溶媒対照群の吸光度の範囲を0.1~0.2と明記した新たな実験実施手順書が作成された。そして実行委員会は新たに10物質(LLNA法の結果を参考に設定された3用量ずつ)を用いて7施設でバリデーションを実施した(第2実験)。その結果、溶媒対照群のBrdU取り込み量を示す吸光度を規定した0.1~0.2の範囲内に収めるという事前に決めた実験の成立基準を満たすことができる実験は全体の約6割であった。これは、事前に定めた基準が厳し過ぎたためであると考えられた。また、細胞浮遊液をさらに希釈すると、細胞の均一な懸濁が保たれていないと考えられるような測定値が頻発し、ばらつきが大きくなることが明らかになった。このため、バリデーション実行委員会は、コードが開示され、結果を確認した後になるが、基準を緩和し、保存後の希釈液での測定を行わず、陽性対照物質HCAの濃度50%におけるSI値が2以上を実験成立条件として、第2実験の結果を解析した。このような解析ではSI値の濃度依存性はごく一部を除いて認められ、概ね施設間差は小さく、LLNA法との対応は良好であった。

申請者の自家試験結果を合わせて全30物質で評価した結果、本法の感度(83%)、特異性(92%)、陽性予測度(94%)、陰性予測度(79%)、一致度(87%)はいずれも高く、LLNA-BrdU法はLLNA法の代替として有用

であると結論された。

## A. 緒言

医薬品等の皮膚感作性は主に Guinea Pig Maximization Test 法 (GPMT 法)、Buehler Test 法 (BT 法) やその変法などで評価されてきたが、試験期間が GPMT 法で 24 日、BT 法で 38 日程度と長く、作業負荷やコストが多大である面や長時間の閉塞貼付や Freund' s Complete Adjuvant の使用など 動物にストレスを与えることによる動物愛護の面で問題もあり、新しい方法が求められてきた。近年、これらの点を解消する試験法として Kimber ら (1986) や Basketter ら (1996) によりマウスを用いる Local Lymph Node Assay (LLNA) が提案され、欧米を中心にバリデーションが行われ、広く使用されるようになった。OECD の安全性試験法ガイドラインとしても 2002 年に承認された (OECD, 2002)。しかし、この方法は <sup>3</sup>H で標識された Methyl-thymidine の DNA への取り込みを指標とする方法であるため、RI の取扱い規制の厳しい日本での普及は不十分であった。RI を用いない方法としては我が国の施設で開発された Bromodeoxyuridine の取り込みをみる方法 (BrdU 法) (Takeyoshi et al, 2003) および ATP 含量を測定する方法 (LLNA-DA 法) (Yamashita et al, 2005) が開発され、代替法に関する厚生労働科学研究班 (主任研究者: 大野泰雄) に新しい動物実験代替法として申請された。研究班ではこれらの方法が RI を用いないという利点以外にも簡便、かつ比較的短期間で終了する方法であることから、評価に値する方法であると考え、日本動物実験代替法学会 (代替法学会) に評価を依頼した。これを受け、代替法学会では評価委員会において、LLNA-DA 法については平成 16 年度より、LLNA-BrdU 法については平成 17 年度より主に申請者の提出した資料に基づき一次評価を行った。その結果、これらの試験法は原法である LLNA 法とほぼ同様の原理による方法であること、ほとんど同一の識別能力を持つこと、RI を用いないこと、簡便であり、比較的短期間で結果が得られるといった利点があると判断した。しかし、行政試験法として評価する為には、更にデータの信頼性や施設間再現性についての情報を得る必要があることから、多施設バリデーションの実施を代替法学会に依頼した。代替法学会のバリデーション委員会はこの依頼を受けバリデーション実行委員会を組織し、バリデーション研究を行った。今回、LLNA-BrdU 法についてのバリデーションが終了し、その報告を受けたことから、評価委員会ではバリデーション研究報告書並びに関連して収集した情報に基づき、LLNA-BrdU 法が LLNA 法の代替法として妥当であるか否かを、更に評価することとした。

なお、LLNA-DA 法に加えて、更に LLNA-BrdU 法について評価することとなった理由は、本試験法の一次評価において、LLNA-BrdU 法では、感作誘導法が LLNA 原法と同一であり LLNA-DA 法より原法に近い試験法と考えられること、また、実際に試験を行う現場では試験法に複数の選択肢ができるのが望ましいと判断したことによる。

## B. 評価方法

### B-1) 評価組織

一次評価報告書に記載した。

なお、一次評価の際の委員であった金澤由基子、五十嵐良明および牧栄二は評価の対象となったバリデーションに参画したことから、今回の二次評価には関与しなかった。

### B-2) 提案者

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

### B-3) 秘密の保持と評価結果の公表について

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

### B-4) 評価に使用した資料および会議資料

二次評価に使用した資料について、以下に示した。

資料 1) (財) 化学物質評価研究機構より提案のあった皮膚感作性試験代替法 (LLNA-BrdU 法) の一次評価報告書

資料 2) LLNA-BrdU 法バリデーション研究 (第 1 実験) 報告書 (2007. 12. 24)

資料 3) LLNA-BrdU 法バリデーション研究 (第 2 実験) 報告書 (2008. 8. 6)

資料 4) 2008 年トキシコロジー学会発表原稿「LLNA-BrdU 法の施設間バリデーション研究 (第 2 次)」

資料 5) 2008 年免疫毒性学会発表原稿「非 RI による LLNA 法のバリデーション研究 (試験概要)」

会議の記録は以下のとおりである。

第 1 回 LLNA-BrdU 評価委員会 (2008. 10. 28) 議事録

第 2 回 LLNA-BrdU 評価委員会 (2008. 12. 9) 議事録

### B-5) 評価の方法

評価委員会では、事前に資料を委員に配布した上で、会議を開催し、代替法学会における LLNA-BrdU 法バリデーション実行委員長である小島肇博士よりバリデーションの計画と実施経過および結果について説明を受けた。その報告について、質疑応答を行った上で、LLNA-BrdU 法の施設内再現性、施設間再現性および LLNA を代替できる可能性について評価を行った。その際、今回のバリデーションの結果だけでなく、申請者である (財) 化学物質評価研究機構より新たに提供を受けた以下の資料を合わせて評価を行った。

申請者より提供された追加資料

追加資料 1) LLNA-BrdU 法の施設間バリデーション研究 (第 2 次) (2008. 10. 28)

追加資料 2) 非 RI による LLNA 法のバリデーション研究 (試験概要) (2008. 10. 28)

追加資料 3) 第 21 回動物実験代替法学会における LLNA-BrdU 法の Transferability に関する発表について (2008. 12. 9, 修正; 2008. 12. 15)

追加資料 4) LLNA-BrdU 法の判定基準について (2008. 12. 9, 修正; 2008. 12. 19)

追加資料 5) 判定基準に関する議論の推移 (2008. 12. 9)

追加資料 6)  $\tau^2$  を解析に用いなかった理由等 (2008. 12. 9, 修正; 2008. 12. 21)



#### B-6) バリデーション参加者および参加施設名 (表 1)

バリデーション実行委員は表 1 に示したように13名であり、計画の立案、実行、データ解析に関与した。バリデーション実行委員の所属施設のうち、第1実験では9施設が、第2実験では7施設が実験を行った。なお、第2実験前に実施された予備実験は、第1実験に参加した9施設で行った。

#### B-7) 被験物質名 (表 2)

第1実験で用いられた12種の被験物質および第2実験で用いられた10種の被験物質を表2に示した。

### C. バリデーションの評価

#### C-1) 被験物質の選択

第1実験では陽性物質8種(2,4-Dinitrochlorobenzene、Glutaraldehyde、Cobalt chloride、Formaldehyde、3-Aminophenol、Hexylcinnamic aldehyde、Isoeugenol、Abietic acid)、陰性物質4種(Dimethyl isophthalate、Isopropanol、Nickel sulfate、Methyl salicylate)が用いられた。第2実験では陽性物質6種(2,4-Dinitrochlorobenzene、Glutaraldehyde、Formaldehyde、Cinnamic aldehyde、Hexylcinnamic aldehyde、Eugenol)、陰性物質4種(Isopropanol、Lactic acid、Methyl salicylate、Nickel sulfate)が用いられた。陽性物質は、非常に強い、強い、中程度、弱い感作性物質の4種類を全て含むように選定された。これらの被験物質を用いることにより、評価委員会はLLNA-BrdU法によるSI値の施設間再現性、並びにLLNA法陽性物質、陰性物質の判別の施設間再現性を評価することは可能であると判断した。一方、これらの被験物質の数では、皮膚感作性を判断する能力、LLNA法の結果との対応性などを評価する上では数的に不十分と考えられたので、申請者から提出されたデータを含めて評価することとした。なお、試験法の一次評価の際に評価委員会は、バリデーションの被験物質としてFalse positiveとなることが知られている刺激性物質(例えば、塩化ベンザルコニウム、ラウリル硫酸ナトリウム)の評価を考慮する必要があるとしていたが、バリデーションの計画段階において選定されなかった。その理由は、被験物質選考グループにおいて、当初は刺激性物質を含める計画であったが、実験開始前に行われたLLNA変法に関するECVAM Workshop(Basketter, 2008)においてPerformance standardが提案されたことにより、Performance standardに含まれるReference chemicalを含める方が好ましいとの判断をしたためである。ヒトで多くの臨床例があり、感作性陽性であることが明確になっているNickel sulfateは被験物質として選定された。

#### C-2) 被験物質の取り扱い

第1実験では、試料等手配担当者が被験物質を媒体に一定濃度に溶かしたものを各施設へ配布していたため、当初、調製から投与までの被験物質の安定性について留意する必要があると考えた。しかしながら、実験結果は施設間で大きなばらつきが認められ、バリデーション実行委員会により試験法の改良がなされたことから、評価委員会では安定性に関する詳細な検討は行わなかった。一方、第2実験では、用時調製した被験物質溶液が投与に用いられたため、評価委員会は今回のバリデーション目的を考慮のうえ、被験物質の安定性については検討する必要はないと判断した。

### C-3) 1群の動物数

LLNA法における1群の動物数は、個体毎のデータを収集する場合には5匹、1群をまとめて測定する場合は4匹とOECDの安全性試験法ガイドラインに記載されている。先のLLNA-DA法のバリデーションの際には、実験規模の制約、動物愛護の観点から1群4匹を採用したが、施設間再現性は高かった。今回のLLNA-BrdU法では、試験法の申請者の実験手順書では1群5匹以上とされていた。それを評価委員会は一次評価において妥当と認めた。しかし、バリデーション実行委員会は実験規模の制約、動物愛護の観点を考慮し、1群4匹と設定し、申請者の同意を得た。なお、LLNA-BrdU法実験SOP ver1.01には「異常が認められないマウスが36匹に満たない場合は、群番号の大きい順に1群3匹とする。」とあり、一部、1群3匹も認められていた。評価委員会は、動物愛護の観点も考慮したバリデーション実行委員会の設定を尊重することとしたが、1群3匹はLLNA法との差が大きいため、実際にどの程度3匹で行われたかを確認することとした。第2実験において1群3匹で得た結果は、施設6・被験物質Bの低～高用量群の3群及び同じく施設6・被験物質Hの高用量群の計4群のみであり、第2実験全体の群数(126群)に占める割合は約3%に過ぎなかった。また、これらの実験結果は1群4匹の実験で得られたデータと同様の傾向を示したことから、総合判定の結果に影響を及ぼすものではなかったと考察することができ、バリデーション結果に与える影響は小さいと判断した。

### C-4) 評価基準の妥当性

得られたSI値に基づき陽性、陰性を判断する評価基準について、評価委員会による試験法の一次評価の際には「対照群の95%信頼限界が平均値比で1.5以下の時に試験が成立するとし、被験物質群のSI値が1.5以上でかつ統計的有意差が認められるときに陽性と判定することが適当である」としていた。これは提案者から示され、一次評価報告書に記載した基準であった。しかしながら、バリデーション実行委員会は「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以上の場合を陽性と判定する」と修正したので、この修正根拠について確認した。

その結果、評価基準を修正する際にバリデーション実行委員会が確認した点は以下のような事であった。

- ①LLNA原法が複数のエンドポイントの組合せではなく、被験物質投与群のSI値が3を超える場合を陽性とするという単一の基準で判断することから本法も汎用性を考慮すると単一の判定基準とする方が適切である。
- ②ばらつきを抑えるように配慮した標準操作手順書を作成、技術研修会を実施するため、「対照群の95%信頼限界が平均値比で1.5以下の時に試験が成立」は削除可能であると判断できる。
- ③SI値の平均値が2を超える場合を陽性と判定する場合の諸統計値は、Dunnett検定を用いた場合に比較して若干劣るものの、比較的良好な値である。

これらの回答について検討した結果、評価委員会は上記の修正を妥当なものとして認め、了承した。なお、統計学的有意差のみでの評価は、媒体対照群のばらつきが小さい場合には偽陽性が出現しやすく、逆に媒体対照群のばらつきが大きい場合には偽陰性が出現しやすいという欠点について、検討の際に留意した。

### C-5) エンドポイントの妥当性

評価委員会は一次評価報告書において「リンパ節細胞数など他の指標と比較して ELISA 法を用いることの優位性について説明が必要である」と記述し、説明を求めていた。本試験に関わる ELISA 法は費用面、労力面でリンパ節細胞数の測定に劣るのではないかと懸念があったためである。これに対し、本試験法の提案者である武吉博士より「BrdU 測定の細胞数計測に対する優位性について」という回答文書が提出され、その中で、Ulrich らの論文の細胞計測値と武吉博士が ELISA 法を用いて測定した BrdU の測定値を、SI 値を用いて比較し、細胞数計測に比べ、BrdU 取り込み量を基にした方が、低濃度域から高い SI 値を示し、BrdU 取り込み量が細胞数に比べて感度が高いと考察された。これに対し、評価委員より「Ulrich らの用いた動物は雌性 BALB/c マウスで、武吉博士が用いた雌性 CBA/JN マウスとは異なる。LLNA における反応性は BALB/c は CBA/JN に比較して弱いことが推測できる。また、実施した施設も異なる。これでは、両者のデータを比較することができず、両者のデータの差は細胞数計測や BrdU 取り込みといった測定方法による違いではなく動物の感受性や施設による違いであるということを否定できない。したがって、BrdU 測定の細胞数計測に対する優位性はこのデータからは示すことはできないと考える。同じ施設で同じ系統の動物を用いて試験条件を同一にして試験を行い、測定部分だけを変えたデータが必要であると考え」とのコメントが出され、更なる説明が求められた。これに対して、武吉博士より細胞計測値と BrdU 法測定値を厳密に比較し、BrdU 法の方が高感度であることを示したデータは無いが、BrdU 法は細胞分裂の度合い（セル・ターンオーバー）を指標としており、原理的に見て細胞数測定よりも LLNA に近いと回答された。評価委員会は、この回答を了承した。

#### C-6) 試験成立基準

試験成立基準の設定の経緯を以下に示す。

第 1 実験では 12 被験物質を用い、9 施設でバリデーション研究が実施されたが、最終評価の指標となる SI 値は施設ごとに大きくばらついていた。この原因として、バリデーション実行委員会は溶媒対照群における吸光度が小さくなった場合、SI 値の増大を招いてしまうことがあると考察した。そして、この第 1 実験の結果を受けて、バリデーション実行委員会では試験が成立する吸光度の範囲を規定し、吸光度が下限未満とならないように細胞浮遊液の最終容量を事前に検討すると共に、上限を超える場合には、細胞浮遊液を希釈することにより規定範囲内に吸光度を収め、SI 値のばらつきを小さくすることが必要であろうと考えた。これを検証するため、第 1 実験に参加した 9 施設で希釈の影響の検討が、溶媒対照群の BrdU 取込み量を示す吸光度の測定によって行われた。その結果、3 施設では、溶媒対照群の吸光度が規定した範囲の下限未満となったが、そのうちの 1 施設では細胞浮遊液の調製に用いる生理食塩液の容量を少なくすることで溶媒群の吸光度が 0.145 となり、0.1~0.2 の範囲内に収めることができた。この 1 施設及び他の 6 施設も実測で 0.102~0.200 の範囲内に収めることができ、SI 値は安定していた。この検討結果を受け、溶媒対照群の吸光度の範囲を 0.1~0.2 と明記した新たな実験実施手順書を作成し、10 物質を用いて 7 施設により第 2 実験を実施した。しかしながら、その結果は、溶媒対照群の BrdU 取込み量を示す吸光度として規定した 0.1~0.2 の範囲内に収めること等の事前に決めた実験の成立基準を満たすことができた実験は全体の約 6 割であった。この結果に対し、バリデーション実行委員会は、事前に定めた基準が厳しすぎたこと、並びに細胞浮遊液をさらに希釈することがばらつきを生むと考察した。そこで、バリデーション実行委員会は、コードが開示され、結果を確認した後になるが、結果の採用基準を緩和し、保存後に

希釈した試料での測定を行わないという基準での解析を行った。すなわち、溶媒対照群の BrdU 取り込み量を示す吸光度を 0.1~0.2 前後にするように事前に細胞浮遊液の最終容量を決めることとし、吸光度が基準値より大きくなった場合でも細胞浮遊液の希釈は行わないとした。さらに陽性対照物質 HCA の濃度 50%における SI 値が 2 以上を試験成立条件とした。その結果、SI 値の濃度依存性はごく一部を除いて認められ、概ね施設内差・施設間差は小さく、LLNA や他の動物実験との対応は良好となった。

評価委員会は、バリデーション研究報告書に記載された主な解析結果がコード開示後になされたことに対し、本来のバリデーションのあり方に則っておらず、重大な問題として受け止めたが、得られた試験結果（動物試験データでもある）を最大限有効に活用するという点を重視し、この解析結果を評価することとした。

試験成立基準設定の経過に関して、評価委員会は細胞浮遊液を希釈した時に倍率通りの結果が得られない理由を確認した。その結果、細胞浮遊液をさらに希釈すると、細胞の均一な懸濁が保たれていないと考えられるような測定値が頻発し、ばらつきが大きくなるとの回答があった。また、バリデーション研究報告書に記載されている「事前に溶媒対照群の BrdU 取り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」との試験条件に関し、評価委員会は、例えば吸光度 0.05~0.35 を試験成立の範囲とするなど、明確な試験成立範囲を提示しないと施設間でのばらつきの原因になるのではないかと懸念を表明した。これに対し、事前検討における溶媒対照群の BrdU 取り込み量を示す吸光度を 0.1~0.2 前後とすれば、本実験における吸光度は 0.05~0.35 に入るはずであるとの回答があった。そこで、最終的に本実験における溶媒対照群の BrdU 取り込み量の平均吸光度 0.05~0.35 および陽性対照物質 HCA の濃度 50%における SI 値が 2 以上を試験成立条件とするという結論に至った。

第 2 実験のデータ解析において希釈しないで評価するのであれば、第 1 実験は希釈しないで試験を実施した施設が 9 施設中 8 施設であり、第 1 実験のデータを無視することなく、第 1 実験と第 2 実験を合わせた解析を実施すべきではないかとの意見も示されたが、第 1 実験と第 2 実験では被験物質の調製法や細胞浮遊液の調製法が異なる条件で実施されたことから、合わせた解析は好ましくないと考えるとのバリデーション実行委員長の見解もあり、第 2 実験のデータのみで判断することとした。

#### C-7) バリデーションデータの除外

バリデーションデータの除外に関して、第 2 実験の Isopropanol の施設 1 と 6 の低濃度投与群において SI 値が 2 を超えているにもかかわらず陰性としている点が注目された。このようなデータを採用しないことについては、バリデーション前に規定していなかったことであるため、本来のバリデーションの進め方に反するからである。この件に関し評価委員会は、低濃度投与群でばらつきが大きいために SI 値がわずかに 2 を超えたのみであり、中濃度投与群および高濃度投与群では陰性であったことから、バリデーション実行委員会が Isopropanol の施設 1 と 6 の結果を陰性としたことは、妥当と判断した。そして、このような場合以外は SI 値が 2 を超えた時、たとえわずかであっても陽性として評価されていることを確認した。

#### C-8) 再現性評価の指標

評価委員会は第 2 実験における施設内再現性、施設間再現性を評価する場合の指標として、LLNA-DA 法の時に用いられた  $\tau^2$  が今回も用いることができるのではないかとバリデーション実行委員会へ意見した。

これに対しバリデーション実行委員会は、 $\tau^2$ は再現性評価の補助手段に過ぎず、LLNA-DA法の時もそのような位置づけであったと回答した。回答書には、「 $\tau^2$ は対数 SI 値における施設間分散である。各施設の個々の実験から得られた SI 値（もしくは対数 SI 値）のみを用いて、分散を推定した場合、SI 値そのもののばらつきを考慮していないことになる。そこで各実験の対数 SI 値の分散を施設間と実験内に分解し、施設間に相当する分散を $\tau^2$ とした。理想的には、 $\tau^2$ のような指標に関して、事前に許容できる値を設定し、研究を行うべきであるが、そのようなことは LLNA-DA 法の研究でも行っていない。また、我々はその経験も少ない。さらに、この指標が適切に施設間差を評価しているかどうかについては十分な検討が必要であり、LLNA-DA 法の研究でもグラフを中心に考察を行い、 $\tau^2$ はその補助指標として導入したに過ぎなかった」と記載されている。そして、参考として LLNA-BrdU 法の第 2 実験で求めた施設間差に関する $\tau^2$ の結果が提示された。

#### C-9) 施設内再現性

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

#### C-10) SI 値の施設間再現性

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

また、バリデーション実行委員会より LLNA-BrdU 法の第 2 実験で求めた $\tau^2$ の結果が提示されたので、評価委員会ではそれに基づいて補助的に施設間再現性を検討した。その結果、10 施設の 3 濃度段階における $\tau^2$ の計算値 30 個のうち LLNA-DA 法における暫定的な基準である 0.182 を上回る値は 10 個、そのうち 4 個は 0.2~0.3 程度でそれほど大きな値では無かった。高濃度、中濃度、低濃度のいずれの濃度でも 0.182 を超える物質は 2,4-Dinitrochlorobenzene、Glutaraldehyde の 2 個であり、このうち 2,4-Dinitrochlorobenzene は 0.3 をわずかに上回る程度であった。1 物質 Glutaraldehyde を除いて概ね施設間再現性は良好であった。評価委員会は、バリデーション研究（第 2 実験）報告書の 25~26 ページの図からの視覚的な判定を主とし、施設間再現性評価の補助的手段として $\tau^2$ を用いて検討し、LLNA-BrdU 法の施設間再現性は概ね良好であると考察した。なお、 $\tau^2$ の暫定的な基準である 0.182 は、LLNA-DA 法の時に用いられた指標  $\exp(\tau^2)$  の 1.2 に該当する数値である。

#### C-11) 感作性の有無の判定の施設間再現性

LLNA-BrdU法の施設間再現性については、第2実験での各施設の感作性の有無の判定結果により検討した。施設間で食い違う判定をした被験物質は、7つの陽性物質（28試験）の内 Formaldehyde と3つの陰性物質（12試験）の内 Lactic acid で、それぞれ1施設が他の2施設と異なる判定を示したのみであったことから、評価委員会は感作性の有無の判定の施設間再現性は概ね良好であると考えた。

#### C-12) 技術移転性

技術移転性については、バリデーション研究報告書には記載されていないが、平成20年11月14日に開催された代替法学会の21回大会において、協和メディカルサービス株式会社の兵頭洋平先生と大阪大学の寒水孝司博士の共同研究「動物実験代替法のバリデーションにおけるtransferabilityの統計的評価法に関する研究」で解析結果の発表（兵頭ら，2008）があった。寒水博士はLLNA-BrdU法のバリデーション実行委員で解析の担当者である。その発表内容は、技術移転性を2段階で評価するものであり、第1段階では提案施設の背景データのばらつきから得た基準範囲に各施設がおさまるか否かで評価して、能力を有する（Competent）施設を選択し、第2段階ではCompetent施設のデータに施設と実験を変量とした二次元配置変量効果モデルを当てはめ、データのばらつきを、施設間分散、実験間分散、繰り返し誤差に分解し、データのばらつきに占める実験間分散の割合（級内相関係数）を求め、その値によって技術移転性を評価しようとするものであった。その結果は本LLNA-BrdU法は第1段階において7施設中3施設が限界値を超えたために技術移転性が低いというものであった。ただし、発表の際に「提案施設の分散がかなり小さいので技術移転性の評価が厳しくなった」と述べている。

このような報告が行われ、一方でバリデーション実行委員会の作成した報告書には技術移転性についての記載が無かったため、評価委員会はバリデーション実行委員会に対し、技術移転性に関する見解を求めた。これに対し、寒水博士と武吉博士の連名で「今回の結果は第一段階のCompetent施設選定に用いる提案施設の背景データのばらつきが極めて小さい（極めて再現性の良い結果が得られている）ため、結果として他の実験施設のばらつきを過大評価する結果となったものと考えられる。また、competent施設と判断された4施設における級内相関係数 $\rho_i$ は0.06と極めて低い値となっており、試験法に習熟することにより、極めて再現性及び精度の高い試験法であり、高い施設間再現性が期待できる方法であると判断される。なお、今回の発表内容は研究段階の手法についてのものであり、現時点で本法を含めtransferability評価のGold standardといわれる手法がない現状では、本法の結果のみでtransferabilityの評価を行うことは適切ではないと考える。」との回答があった。バリデーション実行委員会からは、代替法学会における研究がバリデーション実行委員会と無関係の研究であるとの位置づけの表明、並びに技術移転性についてはバリデーション実行委員会で検討したことはなく、寒水博士と武吉博士による回答が本件に関する全てであるとのコメントがあった。これを受けた評価委員会は、技術移転性についてバリデーション実行委員会で検討されていない、技術移転性を評価する標準的手法が無い現状においては、LLNA-BrdU法が技術移転性のある試験法なのかどうかについては明確な評価はできないと結論した。しかしながら、評価委員会は寒水博士と武吉博士による回答にあるようにcompetent施設と判断された4施設における施設間再現性は極めて高く、試験法に習熟することにより、再現性及び精度の高い試験が可能となる事、並びに技術移転性を高めるための方法がバリデーション研究報告書や実験手順書で明示されている事などから、本試験法を実際に使用する場面において技術の移転に関して支障となることは無いと推察した。

### C-13) 代替可能性

代替可能性を検討する際の陽性、陰性の判定法として、重み付き平均による方法並びに施設間で食い違う判定の場合に多数の結果を採用する方法（多数決）が考えられる。今回のバリデーション研究で採用されたのはLLNA-DA法の時と同様に重み付き平均による方法であった。評価委員会では両者ともそれぞれに意味のある代表値と考え、多数決による方法についても念のため検討した。その結果、両者の結果は一致しており、どちらを採用しても代替可能性の評価は同じであることを確認した。

LLNA-BrdU 法の LLNA 法に対する感度（sensitivity: 陽性物質を陽性と判定する能力）、特異性（specificity: 陰性物質を陰性と判定する能力）、陽性予測度（positive predictivity: 陽性との結果が得られた物質が陽性である割合）、陰性予測度（negative predictivity: 陰性との結果が得られた物質が陰性である割合）、一致度（accuracy: 判定結果が正確である割合）について、第2実験での感作性判定結果に基づき検討した。その結果は表4に示すとおり、感度、特異性、陽性予測度、陰性予測度、一致度はそれぞれ100、75.0、85.7、100、90.0%であり、いずれも高い値であった。

なお、LLNA-BrdU法とLLNA法で一致しなかった物質はNickel sulfateであった。この物質はLLNA法で陰性の報告が多いので今回の検討ではLLNA法陰性物質として分類している。LLNA法で陽性とのRyanら(2000)の報告も認められる。ヒトにおいては、感作性の報告が多く認められ、陽性物質として分類されている。動物の系統、適用法、エンドポイントをはじめ、どのような試験条件の場合に陽性が得られるのかは、今回のデータを含め、今後も注視していく必要がある。

評価委員会は本バリデーションにおけるLLNA-BrdU法のLLNA法に対する感度、特異性、予測度、一致度に基づきLLNA法を代替できる可能性を考えたが、バリデーションで用いた10物質の結果と一次報告書に書かれている情報だけでは被験物質が少なく、LLNA-BrdU法による代替の可能性について結論できなかった。そこで、LLNA法とLLNA-BrdU法の両者の結果のある物質についてのデータを現時点で集め、合わせて検討した。

### D. 申請者の提出データをあわせた解析結果に基づくLLNA-BrdU法による代替可能性の考察

申請者は30物質についての自家試験結果及び第2実験に使用された化学物質の総合判定結果をまとめて評価委員会に平成20年12月19日に提出した。それによると、表5-1および表5-2に示したように、LLNA法で陽性と報告されている18物質のうち15物質がLLNA-BrdU法で陽性であった（感度83%）。また、LLNA法で陰性とされた12物質のうち11物質でLLNA-BrdU法で陰性であった（特異性92%）。陽性予測度は94%、陰性予測度は79%、一致度は87%であった。また、モルモットを用いた皮膚感作性試験法（GPMT/BT）やヒトでの皮膚感作性試験法（HMT/HPTA）結果と比較しても良好な対応があることが示され、LLNA-BrdU法がこれらの皮膚感作性試験法を代替できる可能性はLLNA法とほぼ同程度であると考えられた。

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

### E. LLNA-BrdUの最終評価まとめ

申請者の提出資料に基づく情報および代替法学会に委託したバリデーションの結果、LLNA-BrdU法は、

欧米に比較し RI の管理に厳しい本邦でも容易に実施できることから LLNA 法に比較して利点があると判断された。また、LLNA-BrdU 法は施設内再現性および施設間再現性が高く、LLNA 法との結果の対応性が高く、皮膚感作性の有無を評価する LLNA 法の代替として有用であると判断された。

#### 参考文献

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 Chem Toxicol* 34(10), 985-97.

Basketter, D., Cockshott, A., Corsini, E., Gerberick, G. F., Idehara, K., Kimber, I., Van Loveren, H., Matheson, J., Mehling, A., Omori, T., Rovida, C., Sozu, T., Takeyoshi, M., and Casati, S. (2008). An evaluation of performance standards and non-radioactive endpoints for the local lymph node assay. The report and recommendations of ECVAM Workshop 65. *Altern Lab Anim* 36(2), 243-57.

Kimber, I., Mitchell, J. A., and Griffin, A. C. (1986). Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. *Food Chem Toxicol* 24, 585-586.

OECD (2002) OECD guideline 429 Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, Adopted 24<sup>th</sup> April 2002. Takeyoshi, M., Sawaki, M., Yamasaki, K., and Kimber, I. (2003). Assessment of statistic analysis in non-radioisotopic local lymph node assay (non-RI-LLNA) with alpha-hexylcinnamic aldehyde as an example. *Toxicology* 191(2-3), 259-63.

Ryan C. A., Gerberick, G. F., Cruse, L. W., Basketter, D. A., Lea, L., Blaikie, L., Dearman, Warbrick, R. J., E. V. and Kimber, I. (2000). Activity of human contact allergens in the murine local lymph node assay. *Contact Dermatitis*. 2000 Aug;43(2):95-102.

Takeyoshi M, Sawaki M, Yamasaki K, Kimber I. Assessment of statistic analysis in non-radioisotopic local lymph node assay (non-RI-LLNA) with alpha-hexylcinnamic aldehyde as an example. *Toxicology*. 191, 259-63. 2003.

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.

兵頭洋平, 寒水孝司 (2008) 動物実験代替法のバリデーションにおける transferability の統計的評価法に関する研究, 日本動物実験代替法学会第 21 回大会要旨集, 158-159, 埼玉.



以上

表1 LLNA-BrdU バリデーション実行委員および所属施設

番号	氏名	所属	役割
1	大森 崇	京都大学大学院医学研究科医療統計学分野	データ管理
2	小島肇	国立医薬品食品衛生研究所薬理部	委員長
3	寒水孝司	大阪大学臨床医工学融合研究教育センター	割付とデータ管理・解析
4	吉村 功	東京理科大学工学部経営工学科	無任所
5	出原賢治	ダイセル化学工業（株）評価・解析センター	動物手配，実験
6	五十嵐良明	国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部	実験
7	金澤由基子	(財)食品薬品安全センター秦野研究所 医療用具試験室	実験
8	武吉正博	(財)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	実験(第1実験のみ)，技術指導
9	青儀 巧	大塚製薬（株）徳島研究所 安全性研究センター 第2研究室	実験
10	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	実験(第1実験のみ)
11	有馬和範	大正製薬（株）安全性研究所	実験
12	湯浅敦子	富士フイルム（株）CSR 推進部 環境・品質マネジメン	実験

		ト部素材試験センター	
13	牧栄二	(財) 食品農医薬品安全性評価センター	実験

表2 バリデーションで用いられた被験物質

物質名	LLNA 法における感作性の有無と程度	第1実験	第2実験
2,4-Dinitrochlorobenzene	非常に強い	○	○
Glutaraldehyde	非常に強い	○	○
Cobalt chloride	強い	○	
Formaldehyde	強い	○	○
3-Aminophenol	中程度	○	
Cinnamic aldehyde	中程度		○
Hexylcinnamic aldehyde	中程度	○	○
Isoeugenol	中程度	○	
Abietic acid	弱い	○	
Eugenol	弱い		○
Dimethyl isophthalate	無し	○	
Isopropanol	無し	○	○
Lactic acid	無し		○
Methyl salicylate	無し	○	○
Nickel sulfate	無し*	○	○

\*: ヒトでは陽性と報告されている。

表3 各施設での個々の物質の判定結果（第2実験）

物質名	LLNA 法における感 作性の有無と程度	施設 1	施設 2	施設 3	施設 4	施設 5	施設 6	施設 7
2,4-Dinitrochlorobenzene	非常に強い	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
Glutaraldehyde	非常に強い	陽性				陽性	陽性	
Formaldehyde	強い	陽性				陽性	陰性	
Cinnamic aldehyde	中程度		陽性		陽性	陽性		
Hexylcinnamic aldehyde	中程度	陽性		陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
Eugenol	弱い		陽性				陽性	陽性
Isopropanol	無し	陰性		陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
Lactic acid	無し			陰性	陰性			陽性
Methyl salicylate	無し	陰性	陰性	陰性				
Nickel sulfate	無し*			陽性	陽性			陽性

\*: ヒトでは陽性と報告されている。

表4 代替可能性の指標（第2実験）

	N	感度	特異性	陽性予測度	陰性予測度	一致度
LLNA-BrdU 法*	10	100%	75.0%	85.7%	100%	90.0%
vs LLNA 法		(6/6)	(3/4)	(6/7)	(3/3)	(9/10)

\*: 被験物資個々の感作性評価については、多数の施設での判定結果に基づいた。

表5-1 : LLNA-BrdU 法による皮膚感作性判定結果と他の試験法との比較

(申請者による自家試験結果)

chemical name	判定結果			
	LLNA-BrdU	LLNA*	GMPT/BA*	HMT/HPTA*
2,4-dinitrochlorobenzene	+	+	+	+
<i>p</i> -phenylenediamine	+	+	+	+
glutaraldehyde	+	+	+	+
trimellitic anhydride	+	+	+	+
formaldehyde	+	+	+	+
cinnamic aldehyde	+	+	+	+
isoeugenol	+	+	+	+
eugenol	+	+	+	+
hexyl cinnamic aldehyde	+	+	+	ND
mercaptobenzethiazol	-	+	+	+
citral	+	+	+	+
hydroxycitronellal	-	+	+	+
<i>p</i> -Benzoquinone	+	+	ND	ND
diphencyclopropenone	+	+	ND	+
<i>m</i> -Aminophenol	+	+	+	+
linalool	-	+	ND	+
Isopropyl myristate	+	+	ND	-
<i>p</i> -Cloroaniline	+	+	+	ND
Nickel sulfate	+	-	+	+
Aniline	-	-	+	+
Glycerol	-	-	ND	-
Propylene glycol	-	-	ND	+
Dimethyl isophthalate	-	-	-	ND
diethylphthalate	-	-	ND	-
methylsalicylate	-	-	-	-
lactic acid	-	-	-	ND
hexane	-	-	ND	-
isopropanol	-	-	-	ND
3-(4-Isopropyl)isobutyraldehyde	-	-	ND	ND
2-Hydroxypropylmethacrylate	-	-	ND	+

\*: K.E.Haneke et al. Reg. Toxicol. Pharmacol. 274-286, 34, 2001.

C.A. Ryan et al., Contact Dermatitis. 43: 95-102, 2000

<http://www.inchem.org/documents/sids/sids/TLANA.pdf>

GMPT: Guinea pig maximization test, BA: Buehler assay

HMT: Human maximization test, HPTA: Human patch test allergen

表 5-2 : LLNA-BrdU 法による皮膚感作性判定結果と他の試験法との比較  
(申請者による自家試験結果)

		LLNA 試験結果	
		+	-
LLNA-BrdU 試験 結果	+	2,4-dinitrochlorobenzene p-phenylenediamine glutaraldehyde trimellitic anhydride formaldehyde cinnamic aldehyde isoeugenol eugenol hexyl cinnamic aldehyde citral p-Benzoquinone diphencyclopropenone m-Aminophenol Isopropyl myristate p-Chloroaniline	Nickel sulfate
	-	mercaptobenzethiazol linalool hydroxycitronellal	Aniline Glycerol Propylene glycol Dimethyl isophthalate diethylphthalate methylsalicylate lactic acid hexane isopropanol 3-(4-Isopropyl)isobutyraldehyde 2-Hydroxypropylmethacrylate

+: 感作性試験結果が陽性、-: 感作性試験結果が陰性

表 5 - 3 代替可能性の指標

	N	感度	特異性	陽性予測度	陰性予測度	一致度
LLNA-BrdU 法*	30	83%	92%	94%	79%	87%
vs LLNA 法		(15/18)	(11/12)	(15/16)	(11/14)	(26/30)



LLNA-BrdU 法バリデーション研究（第1実験）

報告書

報告書作成日：2007 年12月24 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

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

AOO :Acetone/Olive Oil

BrdU: BromodeoxiUridine

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 ValiBrdUtion 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.....	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.....	7
2.1 組織と役割.....	7
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.....	9
2.3.1 技術研修会	
2.3.1 予備試験	
2.4 被験物質.....	9
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.....	11
2.6 データの管理.....	12
2.7 データベース.....	12
2.8 データ解析の方法.....	12
2.8.1 体重, リンパ節重量, ATP 発光量	
2.8.2 SI 値とその95%信頼区間の算出	
2.8.3 施設内再現性, 施設間再現性を評価する方法	
2.8.4 代替可能性の検討の方法	
2.8.5 EC3 の算出方法と刺激のカテゴリー	
2.8.6 ソフトウェア	
3. 結果.....	13
3.1 研究の質について.....	13
3.2 選択された被験物質と割付け結果.....	13
3.3 データの取り扱いについて.....	14
3.4 背景基礎データ.....	15
3.4.1 体重	
3.4.2 BrdU取り込み (吸光度)	
3.4.3 リンパ節重量とBrdU取り込み量の関係	
3.5 LLNA-BrdU の分析感度.....	17

3.6 各被験物質の用量反応関係.....	18
3.7 施設間の再現性.....	19
3.8 施設内の再現性.....	19
3.9 代替可能性.....	20
4. 考察.....	19
4.1 本研究の位置付け.....	19
4.2 本研究の妥当性.....	20
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 個々の被験物質に対する考察	
4.3 本研究の限界と今後の課題.....	21
5. 結論.....	22
謝辞.....	22
参考文献.....	22

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(GPMT/BT法)の代替法として広く知られている。LLNA-BrdU法は<sup>3</sup>H-thymidine の取り込み量の代わりにBrdU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、LLNA-BrdU 法の施設間再現性と代替可能性の検討を主目的とし、LLNA法バリデーションを参考に、多施設キャッチアップバリデーション研究を実施した。

【方法】 本研究はLLNA-BrdU法の実験プロトコールに基づいて実施した。陽性対照物質(50% hexyl cinnamic aldehyde : HCA)以外の12の被験物質のうち、3物質は全9施設で、残りの9物質は3施設毎に評価した。各被験物質をコード化し、3用量に調製して各実験施設に送付した。溶媒対照群のBrdUと取り込み量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】 全施設で評価した陽性対照物質HCAのSI値はバラツキが大きく、実験に用いたすべての被験物質の結果は評価できないと判断された。よって、実行委員会における検討の結果、試験手順書の改良が必要であると考察された。

【結論】 本研究で実施した得られた結果から、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。

## 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。

### 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としては、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) が利用されてきた (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により感作誘導を行うが、BT 法ではFCA を用いず、皮膚への繰り返し塗布により感作誘導を行う点がこれらの相違点である。

### 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<sup>3</sup>H で標識されたチミジン (<sup>3</sup>H-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

化学物質評価機構 (以後、化評研) は、リンパ細胞増殖を検出する指標として<sup>3</sup>H-thymidineの代わりにBrdU (BromodeoxyUridine) 取り込み量に改良した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、動物実験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-BrdU 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

本研究の研究計画には、以下の目的を含むLLNA-BrdU法研究計画書（資料1）に従い実施された。本研究の目的は、LLNA-BrdU法を被験物質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-BrdU 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

### 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法バリデーション研究実行委員会（以下、LLNA-BrdU 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。

当初、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会がLLNA-DA法バリデーション研究の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。このうち、施設の都合により9施設の代表者がLLNA-BrdU バリ実行委として本研究に参加した。

LLNA-BrdUバリ実行委を資料2「LLNA-BrdUバリ実行委」に、実験参加施設とその実験担当者を資料3「実験担当者一覧」に示す。

#### 2.1.2 各組織の役割

LLNA-BrdUバリ実行委の中に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-BrdU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4「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-BrdUの操作法

資料1「LLNA-BrdU法研究計画」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」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/JNCr1j 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：事前に被験物質候補リスト（資料4）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：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 0.5 mLを1回腹腔内投与する。
- ③ BrdU投与の約24時間後に，リンパ節を採取する。
- ④ リンパ節をつぶし，緩衝液を15mL加えて均一な細胞懸濁液を作製し，BrdU測定キットを用い，マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定する。この値が0.2を超える場合には細胞懸濁液の冷蔵保存液を翌日以降希釈して，再測定に用いることができる。



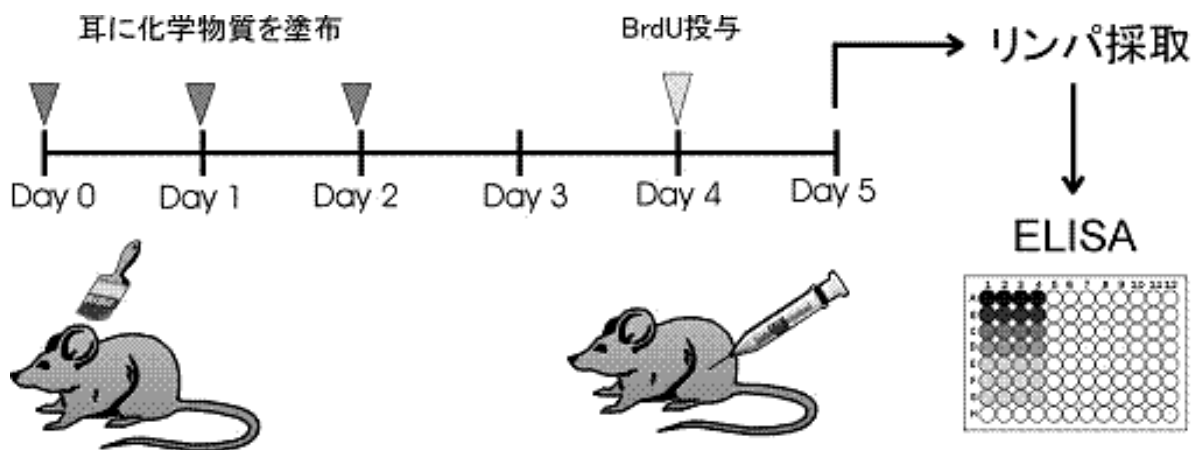


図1. LLNA-BrdU操作法

結果の評価：各個体の BrdU 測定値（吸光度）の平均値を算出した後、陰性対照群の平均値を算出する。

各個体の BrdU 測定値の平均値を陰性対照群の平均値で除した数値(Stimulation Index, SI)を算出した後、各用量群の平均 SI 値およびその標準偏差および標準誤差を算出し、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。

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。（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 操作法の普及

### 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技術研修会を実施した。2006 年 7 月 11 および 12 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（図 2-1 および 2-2）。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法の実習が行われた。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された。



図2-1 実験風景



図2-2 会議風景

### 2.3.2 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、7月3日の第一回実行委員会において、

資料5「LLNA-BrdU 法SOP」に従い陽性対照物質のみを用いた予備実験の実施を決定した。LLNA-BrdUバリ 実行委は、本研究計画書および、LLNA-BrdU 法実験SOPの改訂についての意見を実行委員長に提出した。本実行委は予備試験結果とこれらの意見に基づいて、8月22日の第2回実行委員会で、本研究計画書とLLNA-BrdU 法実験SOPを改訂した。得られた結果から、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 の大きな変更はしなかった。

## 2.4 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した。被験物質の候補リストを資料4「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。これらの物質は先立って行われたLLNA-DAバリデーションと同一の物質とした。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。送付された被験物質およびコード記号一覧を表2として示す。

### 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。

被験物質割付担当者は、表1に概念的に示すように、被験物質選定担当者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。

### 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調製し、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2に示す。

表1. 被験物質の割付方針の概念図

	参加施設A	参加施設B	参加施設C	・・・
標準被験物質 1	○	○	○	○
標準被験物質 2	○	○	○	○
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			○	○
・・・				・・・

表2. LLNA-BrdU法バリデーション研究物質リスト

コード	No.	Chemical name	溶媒	分類	Classification ※	適用濃度 (%)		
D	1	Isopropanol (2-Propanol)	A00	共通	Negative	10	25	50
I	2	Hexylcinnamic aldehyde (Hexylcinnamal, $\alpha$ -Hexylcinnamaldehyde)	A00	共通	Moderate	10	25	50
K	3	2,4-Dinitrochlorobenzene (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene)	A00	共通	Extreme	0.1	0.3	1
E	4	Nickel sulfate (Nickel(II) sulfate hexahydrate)	DMSO		False Negative	1	3	10
F	5	Dimethyl isophthalate	A00		Negative	10	25	50
A	6	Methyl salicylate	A00		Negative	10	25	50
H	7	Abietic acid	A00		Weak	10	25	50
J	8	3-Aminophenol	A00		Moderate	1	3	10
C	9	Isoeugenol (mixture of cis and trans)	A00		Moderate	1	3	10
L	10	Glutaraldehyde solution (ab.25%)	ACE		Extreme	0.1	0.3	1
B	11	Formaldehyde solution (36~38%)	ACE		Strong	1	3	10
G	12	Cobalt chloride	DMSO		Strong	0.3	1	3

## 2.5 実験実施のスケジュール

平成18年8月～12月にかけて各施設が実験スケジュールを立て、実験を行った（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，ATP 測定量）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。

## 2.6.5 データ解析の方法

### 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) 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吸光度および溶媒の吸光度の比で算出される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。

### 3) 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、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 $\exp(t2)$ と表記することにした。 $\exp(t2)$ 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)）。 $\exp(t2)$ 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資料10「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行った。施設内再現性の評価の指標も $\exp(t2)$ を用いた。

### 4) 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（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2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。

### 5) EC3 の算出方法

上記の方法で得た各濃度のSI 値の重み付き平均が2 となる濃度の予測値をEC2 として算出した。算出方法は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2 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2 を上回る場合には、2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EC2 に基づき、感作性のカテゴリーを決め（Gerberic ら（2004））、このカテゴリーでLLNA 法とLLNA-BrdU法を比べた。

### 2.6.6 ソフトウェア

以上の解析は、SAS version 9 を用いて行った。

## 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が、No.9 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8 被験物質分の実験を実施した。

表 3. 被験物質の割付けと実験順序の一覧

施設 割付け番号	第1期		第2期			第3期		
	4群～6群	7群～9群	4群～6群	7群～9群	(10群～12群)	4群～6群	7群～9群	(10群～12群)
5	11 (B)	10 (L)	8 (J)	2 (I)	6 (A)	9 (C)	3 (K)	1 (D)
8	8 (J)	5 (F)	1 (D)	2 (I)	—	3 (K)	6 (A)	—
6	2 (I)	1 (D)	3 (K)	9 (C)	—	10 (L)	11 (B)	—
7	7 (H)	5 (F)	3 (K)	6 (A)	—	2 (I)	1 (D)	—
4	10 (L)	11 (B)	3 (K)	7 (H)	—	2 (I)	1 (D)	—
3	1 (D)	2 (I)	4 (E)	12 (G)	—	9 (C)	3 (K)	—
1	3 (K)	7 (H)	1 (D)	2 (I)	—	4 (E)	12 (G)	—
2	4 (E)	12 (G)	3 (K)	8 (J)	—	2 (I)	1 (D)	—
9	1 (D)	2 (I)	3 (K)	5 (F)	—	—	—	—

### 3.2 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  
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を確認した。
- ・ 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。

- ・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

#### 1) 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・沈殿の有無が異なることが判明した。表4に被験物質の状態観察記録の報告のあった物質のみをまとめた。

表4. LLNA-BrdU バリデーション 被験物質溶液の取り扱い

記号	物質名	施設	被験物質配布者の調製時の状態	問題点	対処事項
B	Formaldehyde	5	溶解	-	
		6		乾きにくい	
		4		高濃度で析出あり	
E	Nickel Sulfate	3	70℃加熱および超音波懸濁	懸濁	超音波処理
		1		懸濁	ボルテック攪拌または超音波処理後、温水で溶解
		2		?	
F	Dimethyl salicylate	8	溶解	懸濁液がチップに詰まる	
		9		高濃度固化	温浴で溶解
		7			
H	Abietic acid	7	高濃度では超音波にて懸濁	高濃度懸濁	
		4			
		1		懸濁	ボルテック攪拌
J	3-Aminophenol	5	溶解		
		8			
		2		析出あり	

その他被験物質で調製法に配慮したもの：G 超音波溶解

### 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5、表6に示す。施設によっては1日目に比べ6日目の体重が減っている施設もあったら、全体として施設間の大きな変動はみられなかった。

表 5. 1 日目の体重の基本統計量

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	132	22.3	1.14	19.7	21.50	22.10	23.00	25.1
2	108	22.6	1.53	19.1	21.50	22.40	23.80	26.1
3	108	22.5	1.26	19.7	21.50	22.40	23.45	25.3
4	108	22.5	1.36	20.3	21.45	22.30	23.35	27.1
5	105	22.0	1.37	18.9	20.80	22.10	22.90	25.6
6	108	22.4	1.30	19.3	21.50	22.55	23.30	25.7
7	108	22.6	1.41	19.5	21.55	22.50	23.50	26.1
8	108	23.3	1.56	20.0	22.00	23.25	24.25	28.3
9	72	22.7	1.26	19.2	21.75	22.75	23.55	25.6

表 6. 6 日目の体重の基本統計量

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	132	23.1	1.26	20.8	22.20	22.90	23.90	26.5
2	108	22.4	1.50	18.5	21.40	22.05	23.30	26.1
3	108	22.8	1.42	19.9	21.85	22.80	23.60	26.7
4	108	23.3	1.48	20.4	22.30	23.10	24.05	27.9
5	105	21.9	1.43	19.1	20.80	21.90	22.80	25.4
6	108	22.7	1.29	18.9	21.85	22.85	23.60	25.4
7	108	22.8	1.53	19.7	21.70	22.60	23.90	26.6
8	108	23.3	1.55	20.6	22.10	23.25	24.45	27.5
9	72	23.3	1.36	20.3	22.45	23.10	24.20	26.8

### 3.4.2 BrdU取り込み量（吸光度）

表7に各物質の溶媒および用量毎の吸光度の平均と標準偏差を示す。溶媒の吸光度が施設毎で大きく異なった。図3に示すように、陽性対照の吸光度も大きな差を示した。施設間で比較した結果、その値は10倍程度異なった。この理由として、施設毎の希釈方法の違いが挙げられる。これについては考察に詳細を記す。

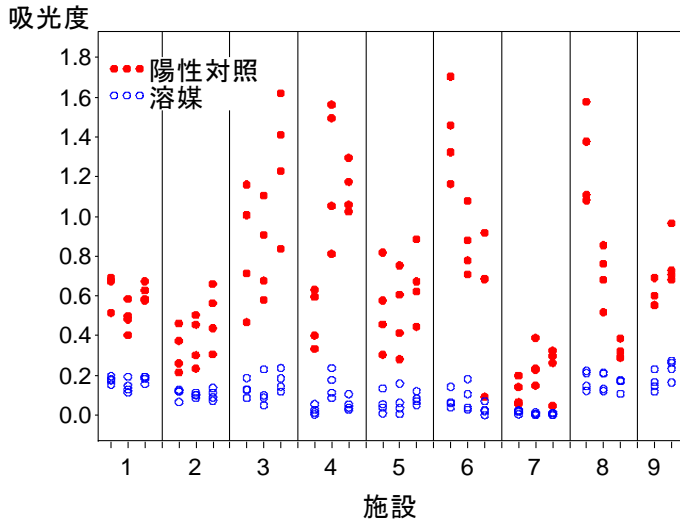
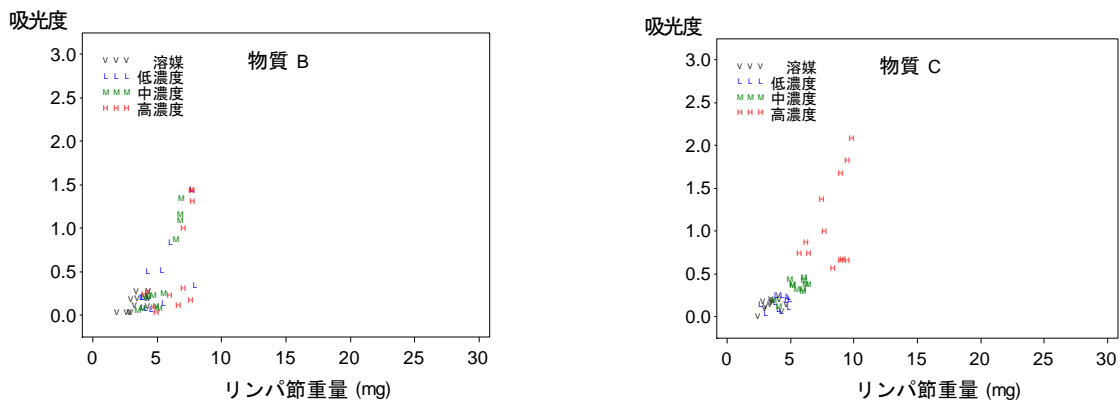


図3. 各施設におけるBrdU取り込み量（吸光度の分布）

### 3.4.3 リンパ節重量とBrdU取り込み量の関係

リンパ節重量と吸光度の関係を評価できる物質の結果のみを図4に示す。リンパ節重量と吸光度の間に直線的な関係があるものもあったが、直線関係にないと考えられる物質も認められた。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吸光度とリンパ節重量の間に直線的な関係がない場合には、各施設で適切な操作が実施されなかったことを示している。





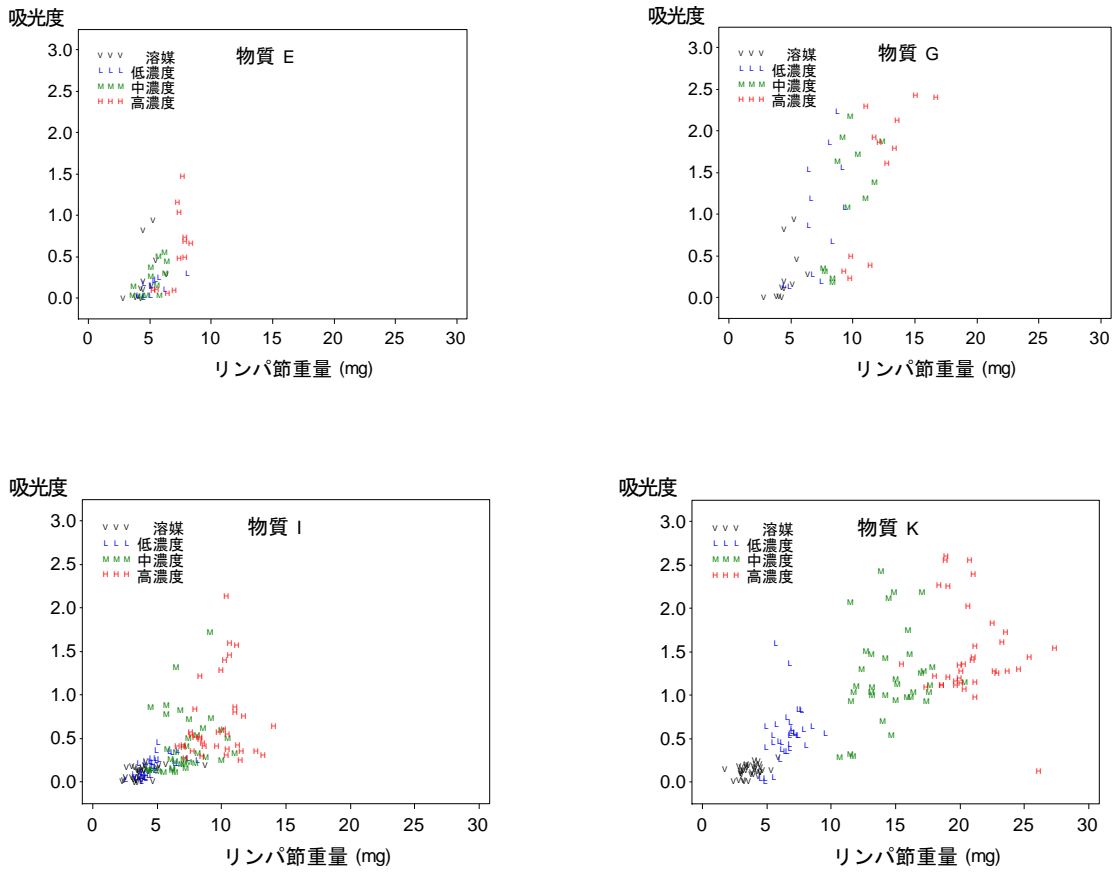


図4. 吸光度とリンパ節重量の関係

### 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5、図6 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。

予備試験および本試験ともいずれも陽性と判定する基準値であるSI 値2を超えていた。しかし、SI値の範囲は予備試験の平均値が2~6であるのに対し、本試験では2~30に上がっていた。この結果からも予備試験と本試験間で施設内および施設間差が極めて大きいと考えられた。

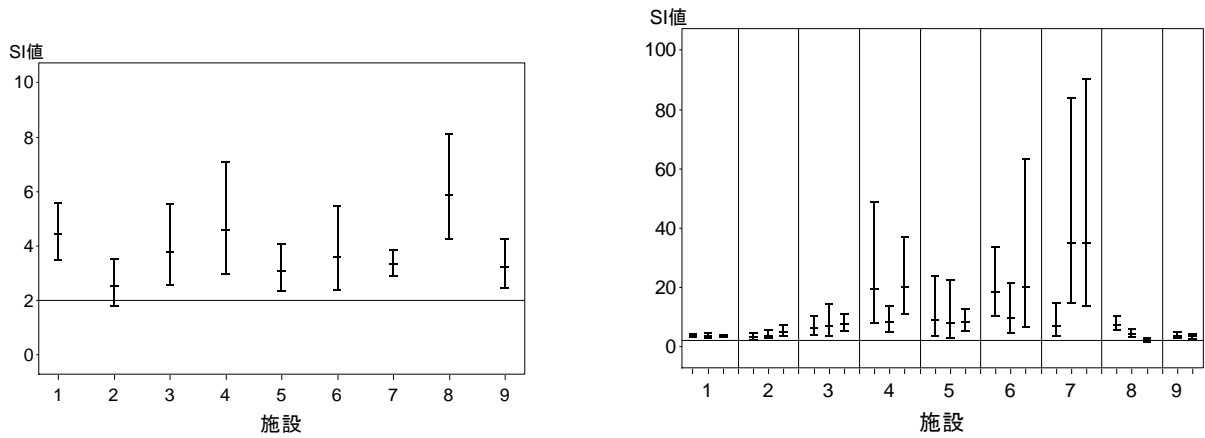


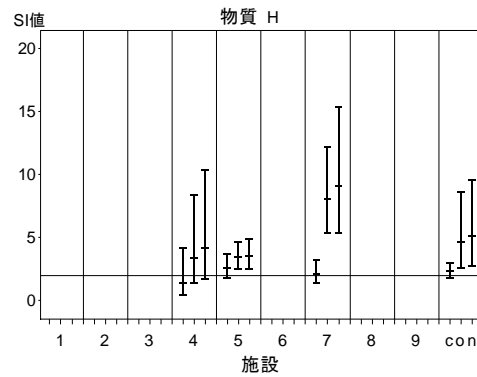
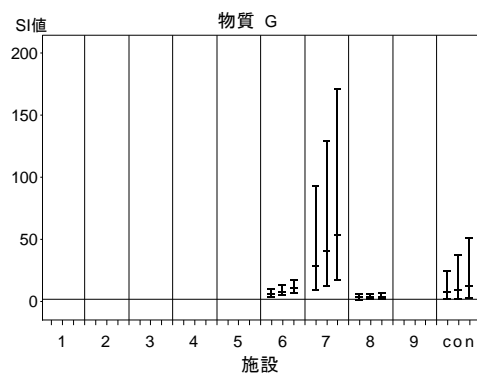
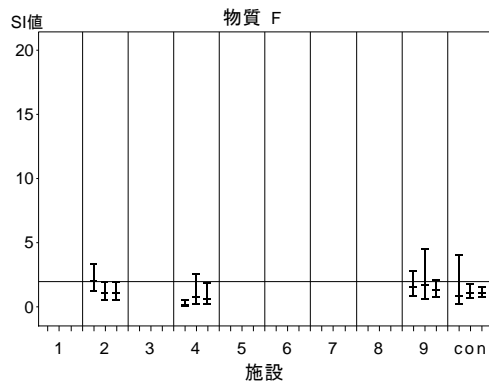
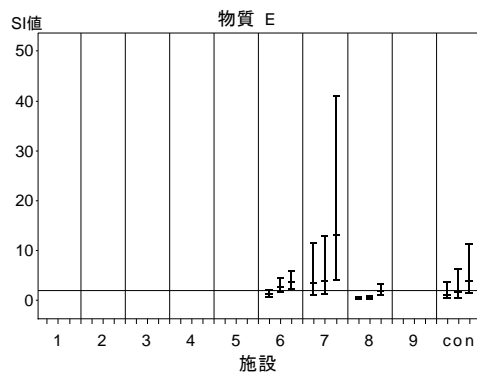
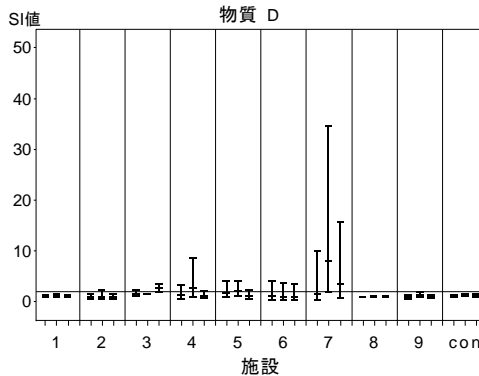
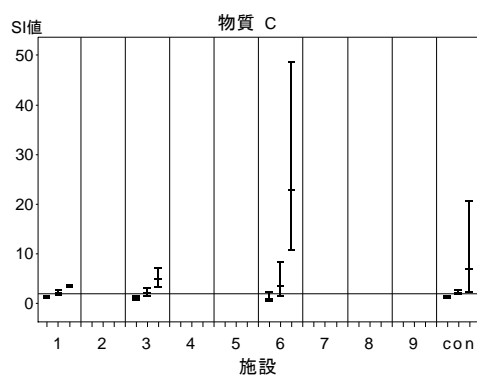
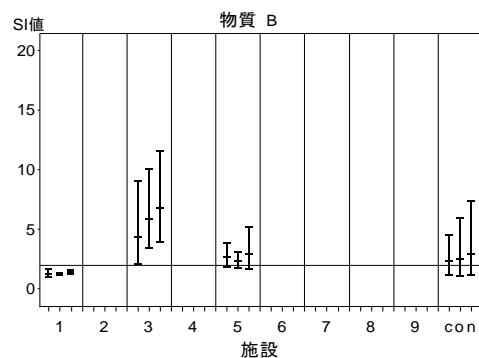
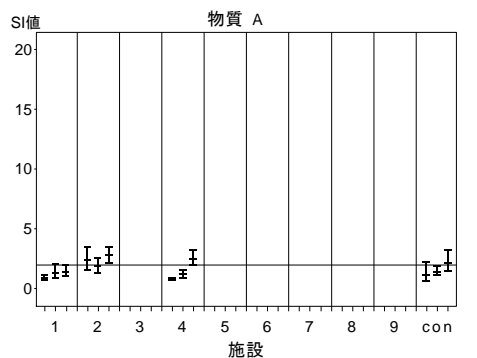
図5. 予備試験のSI値

図6. 本試験のSI値

### 3.6 各被験物質の用量反応関係

図7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。

ほとんどの物質において、各施設のSI値の信頼区間が大きく、正当に評価されていないと判断した。



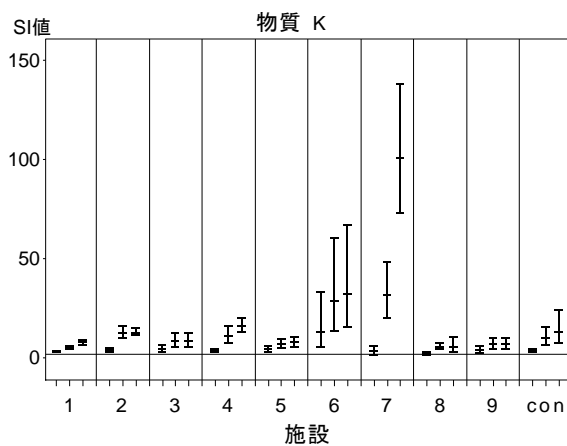
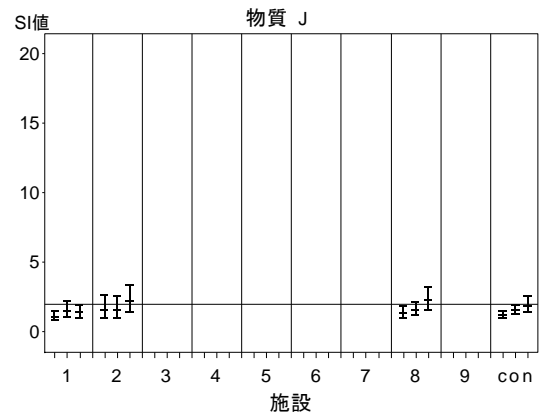
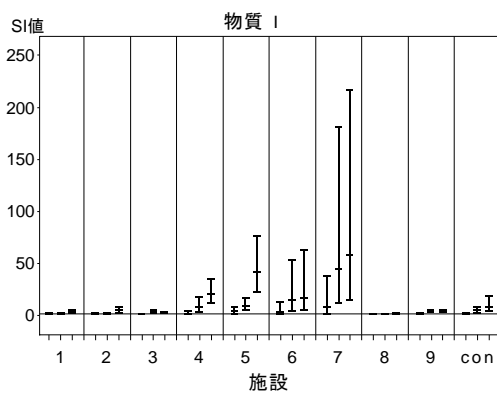


図7. 物質毎に各施設のSI値

### 3.7 施設内再現性

図5, 図6の結果からほとんどの物質において, 各施設のSI値の信頼区間が大きく, 施設間再現性が良好ではないことが明らかになった.

### 3.8 施設間再現性

図5~7の結果からほとんどの物質において, 各施設のSI値の信頼区間が大きく, 施設間再現性が良好ではないことが明らかになった.

### 3.9 代替可能性

この検討を行う以前の問題が解決されていないことから, 比較は実施しなかった.

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) の文献の値を用いる予定であったが, 比較しなかった. 対象となる試験法との対応性として, GPMT/BT 法を基準としたが, やはり比較は実施しなかった.

## 4. 考察

### 4.1 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 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Catch-up バリデーション研究に該当するといえると考えた。

## 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、感作性の評価に関する原理は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することである。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ることができる。また、再測定が可能である。

### 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12 被験物質を選択した。LLNA 法による文献のEC2 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 物質であり、試験物質の選択は妥当と考えた。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理由として、①予備試験なしで使用動物数を抑え、②各被験物質の同一濃度での結果を比較すること、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、溶解または懸濁方法の統一化、⑤複数被験物質における用事調製操作の簡便化、ミスの削減が大きな目的であった。そのため、①選択物質も安定性が高いものになった、②実験開始の1週間前に調整し、DMSOを溶媒とする被験物質を除いて冷蔵で送付し、使用までの冷蔵保管を徹底した、③実験時の状態確認および溶解、均一懸濁液の調整を徹底した。結果として、被験物質の安定性を疑問視する声もLLNA-BrdUバリ実行委の中からも上がったが、長短所を比較して事前調整が選択された。また、LLNA-DAバリデーション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。

表4に示すように、被験物質によっては析出、懸濁などの記録が残されたが、施設間でかけ離れた対処を行っていないことを事後の聞き取り調査などで確認した。

### 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、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を統一した。被験物質名は遮蔽されていたにもかかわらず、9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の施設間再現性は良好でなかったため、これらの配慮は結果に反映されなかった。

### 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 個々の被験物質に対する考察

バラツキのない方法の改善が必要なことから、個々の物質について考察しない。

#### 4.3 本研究の限界と今後の課題

本方法は、希釈によって再測定が可能である利点を持つが、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しまった。この研究の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液を希釈して測定を行うことと決めていたが、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（資料11参照）。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ることになる。これが施設間差の大きかった一因であると考えられた。

実験操作によるばらつきが大きかった点に対して、LLNA-BrdUバリ実行委にて議論し、特に以下の点について対応策、改善点が決まった。

- 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、変更することが出来るが、陰性対照ウェルの吸光度が0.1-0.2となる条件を採用する。この範囲にあることを実験の成立条件とする。
- ② AOO群または溶媒群の平均吸光度が0.2を超えた場合には細胞浮遊液を更に希釈後、再測定を行う。0.1を下回った場合には解析対象から外す。なお、予め数段階の希釈懸濁液（5～15ml 懸濁液を調整し、生理食塩液で希釈した浮遊液）を調製し、同時に測定を行っても構わないが、その際には実験成立条件を満たす1データのみを採用する。
- ③ブランクは差し引く
- ④その他、実験者から上がってきた試験操作法の問題点もSOPに追記する（BrdU腹腔内投与、懸濁液の調整、洗浄・乾燥操作など）

さらに本研究にはいくつかの限界がある。それらについても記載する。

##### ・被験物質について

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。

##### ・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。用事調整でないことから、物質の安定性についてはデータがない限り反論できない。

##### ・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験経験のある施設を選んだ。LLNA-DA法バリデーションから続く試験法への慣れが、推測での選択につながった可能性もある。

## 5. 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した。検討結果としては、吸光度で測定する溶媒のBrdU取り込み量の大きさにSI値が大きく依存すること、ブランクに関する処置が不明確であったこと、希釈の影響が十分にわかっていなかったことが考えられ、これらを反映させるべきである。

## 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致します。

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），正門孝臣（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, DA., 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, DA. 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, DA., 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, DA., 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, DA., 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, DA., 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, DA., 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, DA., 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, DA., 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 49 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 DA. (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, DA. (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, DA., 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, DA., 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, DA., 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, DA., 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. 50
- 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, DA., 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.

Takeyoshi, M., Yamasaki, K., Yakabe, Y., Takatsuki, M. and Kimber, I. (2001). Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicology Letters* 119, 203-208



## 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 皮膚感受性	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<sup>3</sup>Hで標識されたチミジン (<sup>3</sup>H-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、<sup>3</sup>H-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<sup>3</sup>Hで標識されたチミジン (<sup>3</sup>H-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、<sup>3</sup>H-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, 2001)。

### 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/JNCrIj 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.

両耳介に被験物質を3日間続けて塗布する.

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.

BrdU投与の約24時間後に, リンパ節を採取する.

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, 陰性対照ウェルの吸光度が0.1~0.2となる細胞浮遊液の容量を決定する.

リンパ節をつぶし, プラスチック容器に 決められ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.

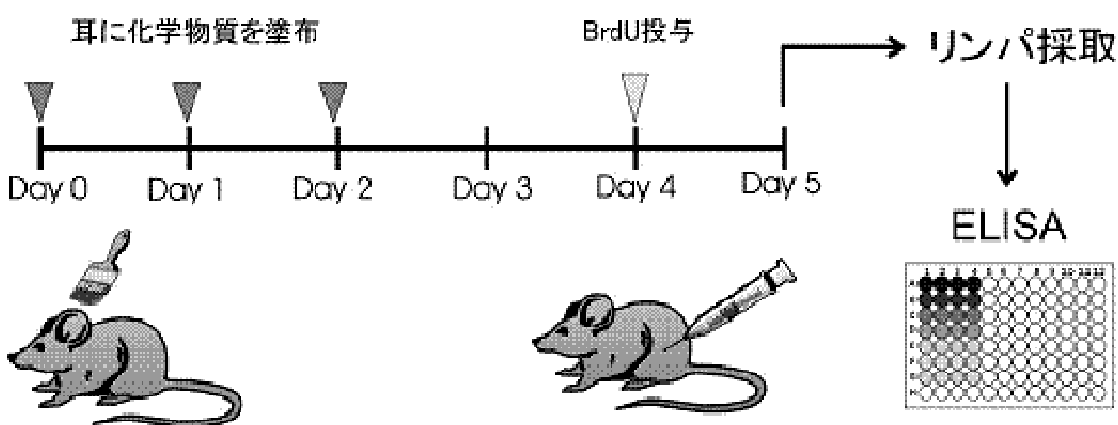


図1 . LLNA-BrdU操作法

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。

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、陰性対照ウェルの吸光度が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。

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。

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。

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、

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

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, -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	EWH5685
G	4	Methyl salicylate	A00	Negative	10	25	50	Wako Pure Chemical Industries,Ltd	98	EWH6518
A	5	Nickel sulfate (Nickel( ) 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	EWF7698
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なデータが入力されていないか、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て確認した．

- ・ 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て、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ポ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) 施設番号							データ採否(2) 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.

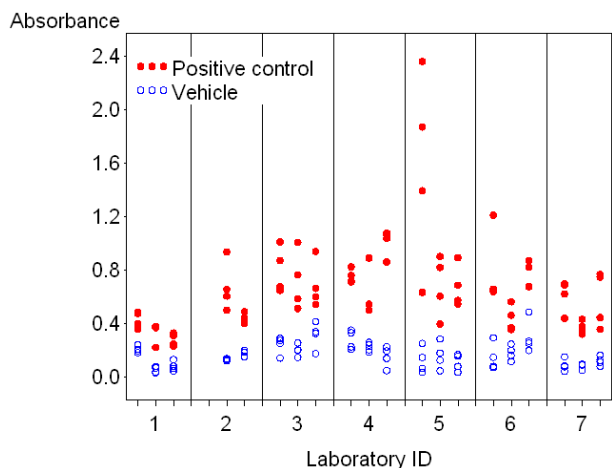


図3. 各施設のBrdU取り込み量（吸光度の分布）

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	95%CI
							lower	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	95%CI
							lower	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	95%CI
							lower	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。

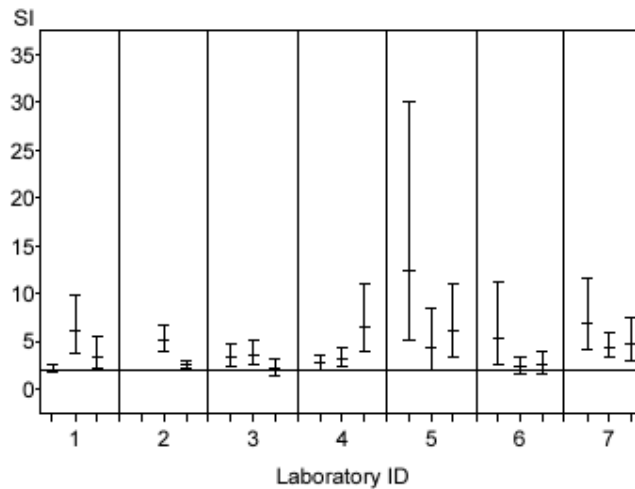
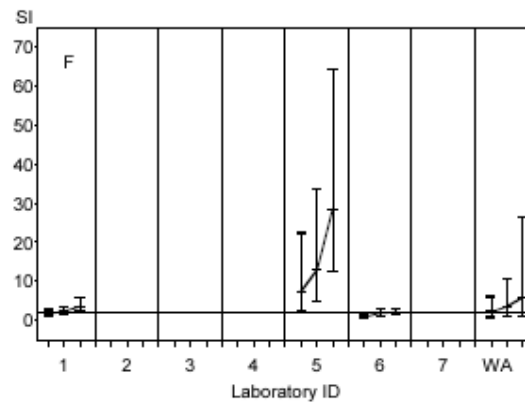
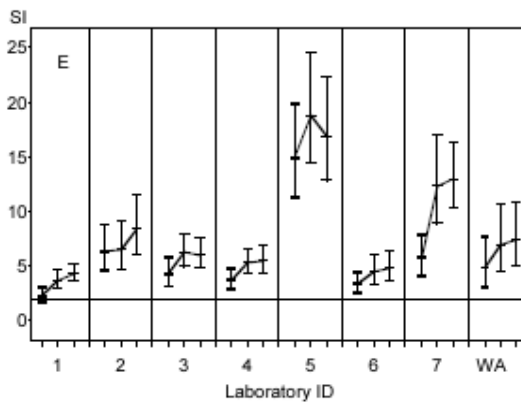
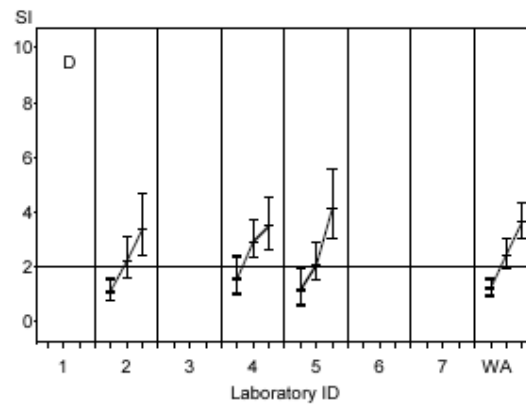
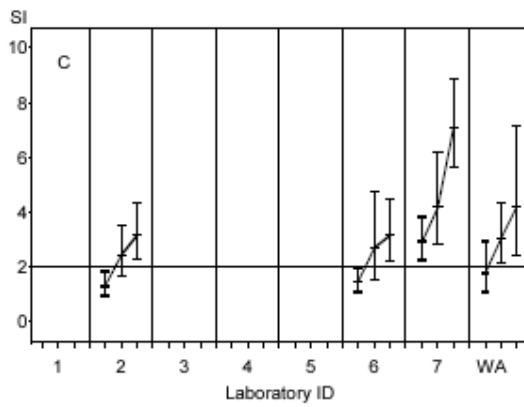
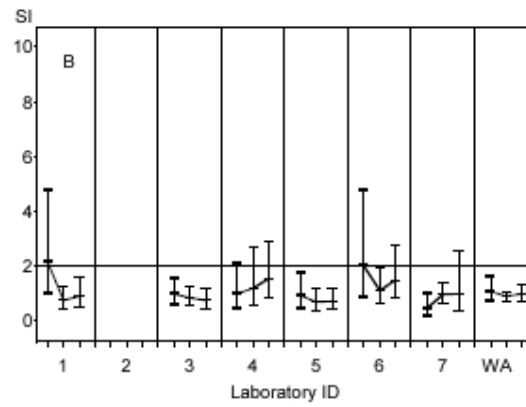
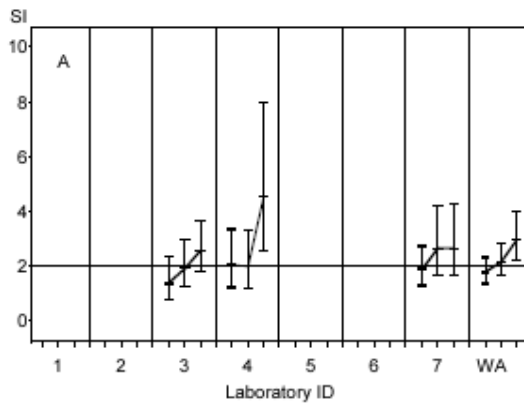


図4．第2次バリ実験のSI値

## 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。





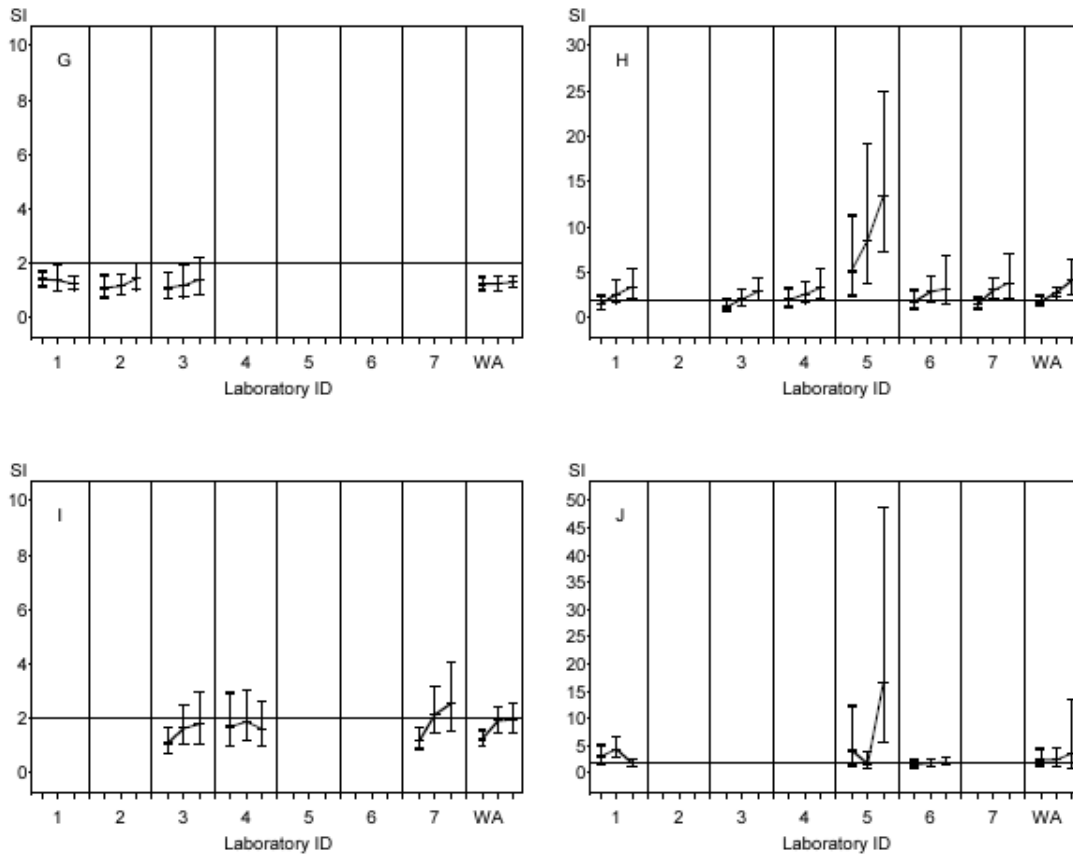


図5.物質毎に各施設のSI値

### 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
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
F	Glutaraldehyde	Extreme	P				P	P	
G	Methyl salicylate	Negative	N	N	N				
H	Hexylcinnamic aldehyde	Moderate	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	3
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	85.70%	100%	90%	100%	100%
		(6/7)	(3/3)	(9/10)	(6/6)	(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。各被験物質の同一濃度での結果を比較する、適用濃度から感作性の強度を予測できないようにする、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。

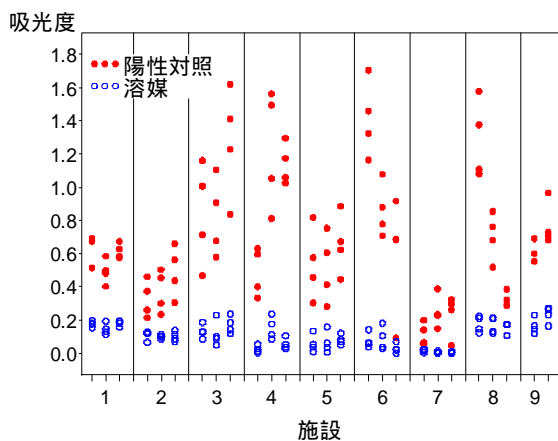
測定値がこの研究のために準備された一定の書式のデータシート(資料8)に正しく記録されているかどうかを確認するために、データクリーニングが行われ、実験中にデータシートのプリントアウトに入力されたデータと入力されたファイルとの値の整合性が確認された。なお、このデータシートは入力規制機能を用いて、不適切な値が入らないように設計された。なお、各施設から集められたデータシートの電子ファイルは、プログラムにより一括して読み込まれ、データベースが作成されている。

#### 4.2.5 本研究の判定基準の変更について

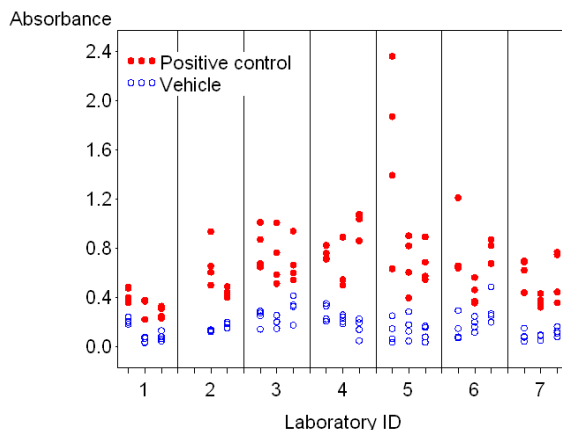
本研究で用いた SOP では、各試験施設において実施された予備実験の結果に基づき、陰性対照ウェルの吸光度が 0.1~0.2 となる細胞浮遊液を調製し実験した。そして、溶媒の BrdU 取り込み量の吸光度の平均値が 0.1~0.2 の範囲に含まれない場合には細胞浮遊液の冷蔵保存液を翌日以降希釈し、再測定するとなっていた。

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。

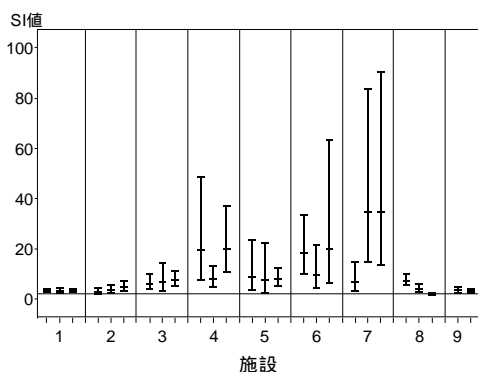


(a) 第1次バリ実験

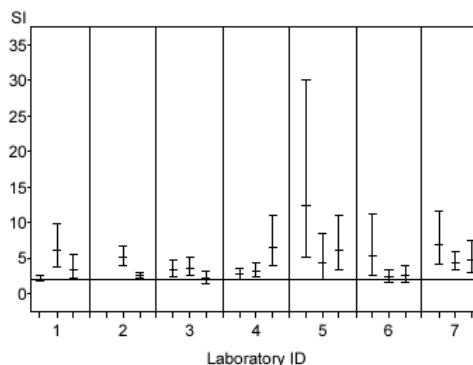


(b) 第2次バリ実験

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。

#### 4.3 個々の被験物質に対する考察

LLNA法やLLNA - DA法のSI基準値が3であるのに対し、本方法のSI値は2であるように、試験法の感度は低い。さらに、LLNA-BrdU法の陽性対照物質HCAの濃度が50%であり、LLNA-DA法では25%で同様の結果が得られる(大森ら, 2007)。しかしながら、表16に示すように、この研究で用いた多くの物質で、判定結果はLLNA法、GPMT/BT法の結果と一致した。また、LLNA法では偽陰性であるA: nickel sulfateがこの研究では、3施設すべてで陽性となっている。

個々の施設の結果ですと比較すると、F: glutalaldehyde、J: formaldehydeの用量反応曲線が施設によってばらついていて、F: glutalaldehydeでは1施設が他の施設と異なった判定結果を示した。J: Formaldehydeも施設6の結果は、SI2をわずかに下回った程度であり、施設間で大きな差があったとは言い難いと考えられた。これらの結果から、aldehydeの反応は評価が難しいと考えられた。ECVAMのperformance standard (Basketter, 2008) の中にも、第2次バリ実験で用いた10物質のうち、この2点のみが含まれておらず、バリレーションには使い難い物質の範疇に入るのかもしれない。

#### 4.4 評価委員会からの提言とその対応

LLNA-BrdUのバリレーション研究の実施を促す評価委員会から、以下の提言を事前に受けた。

- 1) 評価委員の質問への回答に沿ってプロトコルや判定基準が適正な変更を条件に、多施設バリレーションへの移行は問題ないとする。
- 2) 申請法は原理的に既にOECDで承認されたLLNA法とほとんど変わらないことから、バリレーションにおいては、LLNA法との類似性を示すための簡易バリレーションで良いと思われる。
- 3) Core laboratoryは化学物質評価研究機構に務めてもらい、プロトコルを作成してもらおう。また、技術トランスファーを実施してもらおう。
- 4) すでに技術移管の完了している4施設を中心に新規施設を2~3施設加えて、実施してみてもどうかという案がある。
- 5) バリレーションを行う施設はLLNA法の試験経験またはLLNA変法の研究経験を有する施設が良いと思う。
- 6) 評価方法として対照物質を用いる方法(相対的評価)をうまく取り入れた方が吸光度の数値を用いる場合よりも多施設バリレーションに向いているのではないかという意見を含め、検討する。
- 7) 試験期間を1月程度としたとき、1機関で実施可能な被験物質数はプロトコルの内容によって異なるが、陽性対照、陰性対照、被験物質2個(1用量)を1セットとした場合、1週間で実施可能であることから、これを3回繰り返すとして、6検体まで可能と思われる。
- 8) 用量段階は、LLNA法で用いられている濃度から3用量を選定するのが良いと思われる。
- 9) 被験物質候補リストは、提案者の協力を得て作成するのが良いと思われる。なお、LLNA法でfalse positiveとなることが知られている刺激性物質(例: benzalkonium chloride, sodium lauryl sulfate)についての評価も考慮する必要がある。
- 10) 初めはバイアスがなるべく少なくなるように、条件を揃えて実施するのが良い。

本バリレーション研究の実施には、この提言を真摯に受け止め、概ね満たしていると考えられる。最終的な推奨プロトコルでは、データ採用基準の変更はあるものの、LLNA-BrdU法の実験そのものはLLNA法に近いので、LLNA変法として受け入れやすいと考える。

## 5. 結論

本研究で実施した10の被験物質の濃度範囲で得られた結果は、施設内および施設間の再現性がよく、GPMT/BA法およびLLNA法に対する代替可能性も高く、これら試験法との同等性が確認された。LLNA-BrdU法の実験そのものはLLNA法に近いので、LLNA変法として受け入れやすいと考える。

## 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えませんでした。以下の方々に心より感謝致します。

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）、三輪麻紀子（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）、後藤浩彦（大塚製薬株式会社）、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（財団法人食品農薬安全性評価センター）、竹原広（財団法人食品農薬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.
- Basketter, D.A., Cockshott, A.C., Corsini, E., Gerberick, G.F., Idehara, K., Kimber, I., Loveren, H.V., Matheson, J., Methling A., Omori T., Rovida, C., Sozu T., Takeyoshi, M. and Casati S. (2008) An evaluation of performance standards and non-radioactive endpoints for the local lymph node assay, *Alternatives To Laboratory Animals*, 36, 243–57.
- 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 DA. (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, DA. (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, DA., 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, DA., 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, DA., 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, DA., 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.

Saïstad, 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.

Takeyoshi, M., Yamasaki, K., Yakabe, Y., Takatsuki, M. and Kimber, I. (2001). Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicology Letters* 119, 203–208

小島 肇ら (2007) LLNA-BrdU 法バリデーション研究 (第1実験) 報告書

大森 崇ら (2007) LLNA-DA 法バリデーション研究報告書



# LLNA-BrdU 法バリデーション研究 本実験第 2 次 解析結果報告書 Ver0.3

2008 年 7 月 25 日 (金)

寒水孝司

## 改訂履歴

Version	日付	著者	備考
0.1	2008.2.15	寒水孝司	初稿 バリ実行委 (2008.2.15) 提出
0.2	2008.7.17	寒水孝司	小島氏, 大森氏, 武吉氏, 寒水の 4 者による報告書内容に関する打ち合わせ結果を反映
0.3	2008.7.25	寒水孝司	解析結果報告書 Ver0.2 に対する牧氏のコメントを反映

## 目次

<b>1</b>	<b>解析データ</b>	<b>2</b>
1.1	細胞浮遊液の容量と希釈倍率の表記法	2
1.2	データ採否の基準	2
1.3	希釈・再実験の実施状況	3
1.4	データ採否の一覧	7
1.5	欠測データ	8
<b>2</b>	<b>解析の方針</b>	<b>9</b>
2.1	主解析と副次解析	9
2.2	吸光度データの扱い	9
<b>3</b>	<b>背景基礎データの基本統計量</b>	<b>10</b>
3.1	体重	10
3.2	リンパ節重量	11
<b>4</b>	<b>陽性対照の結果 (主解析・副次解析)</b>	<b>12</b>
4.1	SI 値とその 95%信頼区間	12
4.2	吸光度の図示	15
<b>5</b>	<b>被験物質の結果 (主解析)</b>	<b>16</b>
5.1	SI 値とその 95%信頼区間	16
5.2	リンパ節重量と吸光度の関係	23

# 1 解析データ

## 1.1 細胞浮遊液の容量と希釈倍率の表記法

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

表 1: 容量と希釈倍率の関係

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

## 1.2 データ採否の基準

本研究では、次のようなデータ採否の基準を設定する。

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

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

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

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

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

表 2: データ採否の基準

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

### 1.3 希釈・再実験の実施状況

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

表 3: ダイセル化学(施設番号 1)

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

表 4: 食薬センター (施設番号 2)

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

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

表 5: 大塚製薬 (施設番号 3)

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

表 6: 大正製薬 (施設番号 4)

第 1 期	1 回目	再測定	再々測定	データ採否 (1)	データ採否 (2)	
陽	0.281	→	0.055	→	< 0.1	×
	15ml(1)		30ml(2)		22.5ml(3/2)	(範囲外)
被 E D	0.271	→	0.050	→	< 0.1	×
	15ml(1)		30ml(2)		22.5ml(3/2)	(範囲外)

第 2 期	1 回目	再測定	データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.224	→	非実施	
	15ml(1)			
被 B H	0.241	→	非実施	
	15ml(1)			

第 3 期	1 回目	再測定	データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.154			
	22.5ml(3/2)		(1 回目)	
被 I A	0.210	→	非実施	
	22.5ml(3/2)			

表 7: 富士フィルム (施設番号 5)

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

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

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

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



表 8: 安評センター (施設番号 6)

第 1 期	1 回目	再測定	再々測定	データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.150 15ml(1)				(1 回目)
被 H B	0.253 15ml(1)	→ 非実施			
第 2 期	1 回目			データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.183 15ml(1)				(1 回目)
被 F J	0.163 15ml(1)				(1 回目)
第 3 期	1 回目	再測定		データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.304 15ml(1)	→ 0.178 20ml(4/3)			(再測定)
被 C E	0.210 15ml(1)	→ 0.134 20ml(4/3)			(再測定)

表 9: 国立衛研 (施設番号 7)

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

第 1 期	1 回目	再測定	再々測定	データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.089 20ml(4/3)	→ 非実施			
被 H B	0.120 20ml(4/3)				(1 回目)
第 2 期	1 回目	再測定		データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.085 15ml(1)	→ 非実施			
被 C E	0.123 15ml(1)				(1 回目)
第 3 期	1 回目			データ採否 (1)	データ採否 (2)
陽	0.121 15ml(1)				(1 回目)
被 I A	0.145 15ml(1)				(1 回目)

各施設で、少なくとも2件×3時期=6件、データの採否を調べている。したがって、本バリデーション研究全体では、少なくとも6回×7施設=42件、データの採否を調べている。このうち、再実験をすることなく、1回目でデータ採否(1)に適合したのは18/42件(42.9%)である。また、データ採否(1)に適合しなかったにも関わらず再実験を実施しなかったのは8/42件(19.0%)である。

#### 1.4 データ採否の一覧

陽性対照と被験物質に対するデータの採否の一覧をそれぞれ表10と表11に示す。

表 10: データ採否 (陽性対照)

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			×											

表 11: データ採否 (被験物質)

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

非実施「 」と不採用「 × 」を区別せず、いずれも不採用として扱い、データの採用と不採用の数を整理すると表12が得られる。表中の( )内は割合(%)を表す。

表 12: 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 ( または × )	合計	採用 ( )	不採用 ( または × )	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

### 1.5 欠測データ

施設 6 で第 1 期の検疫・馴化期間中に 5 匹が事故死した。予備の動物が 1 匹いるので、結果として、次の 4 条件でそれぞれ 1 件ずつ欠測が生じた。

- 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

## 2 解析の方針

### 2.1 主解析と副次解析

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<sup>1</sup>。ただし、背景基礎データの基本統計量については、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 13 に示す。表中の「×」はデータ採否の基準を満たすデータ存在しないことを表す。

表 13: 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

### 2.2 吸光度データの扱い

吸光度が負になったデータは 0 に置き換えて解析する。

<sup>1</sup>2008 年 7 月 3 日 LLNA-BrdU パリテーション研究打ち合わせメモ参照

### 3 背景基礎データの基本統計量

#### 3.1 体重

施設ごとの体重の基本統計量を表 14 に示す．ここでは，主解析と副次解析の区別はない．

表 14: 体重 (*g*) の基本統計量

25JUL2008:16:32:22								
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

25JUL2008:16:32:22								
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

1.5 節で説明したように，施設 6 で第 1 期に欠測が 4 件生じたので，データ数が他より少なくなっている．

### 3.2 リンパ節重量

被験物質 (濃度) ごとのリンパ節重量の基本統計量を表 15 に示す。ここでは、主解析と副次解析の区別はない。

表 15: リンパ節重量 (mg) の基本統計量

25JUL2008:16:32:22						
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

## 4 陽性対照の結果（主解析・副次解析）

### 4.1 SI 値とその 95%信頼区間

主解析および副次解析における陽性対照の SI 値とその 95%信頼区間を図 1, 2 に示す。個別の数値を表 16, 17 に示す。

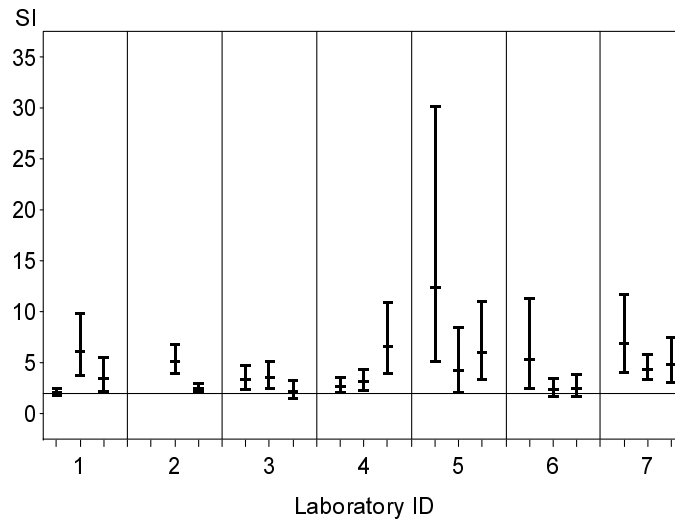


図 1: SI 値とその 95%信頼区間 (主解析: 採否 (2))

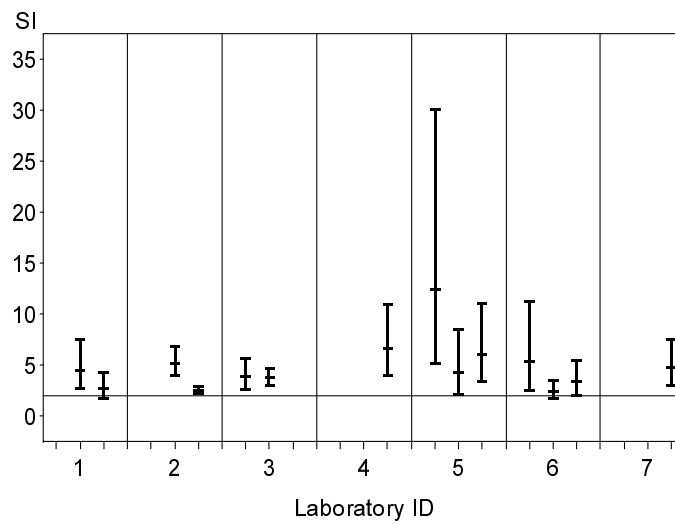


図 2: SI 値とその 95%信頼区間 (副次解析: 採否 (1))

表 16: 施設・時期ごとの吸光度の群内平均, SI 値とその 95%信頼区間 (主解析: 採否 (2))

25JUL2008:16:32:23

Mean abosorbency of the positive control (SI\_PC2.txt)  
Data criterion 2

Labo. ID	Term	Vehicle mean abosorbency	PC mean abosorbency	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 17: 施設・時期ごとの吸光度の群内平均, SI 値とその 95%信頼区間 (副次解析: 採否 (1))

25JUL2008:16:32:23

Mean abosorbency of the positive control (SI\_PC1.txt)  
Data criterion 1

Labo. ID	Term	Vehicle mean abosorbency	PC mean abosorbency	SI	95%CI lower	95%CI upper
1	2	0.115	0.521	4.53	2.75	7.48
	3	0.128	0.341	2.67	1.65	4.31
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	0.134	0.513	3.83	2.61	5.62
	2	0.164	0.616	3.77	3.05	4.65
4	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	0.178	0.589	3.32	2.02	5.45
7	3	0.122	0.581	4.78	3.05	7.50



主解析における溶媒の吸光度の群内平均の基本統計量を表 18 に示す .

表 18: 溶媒の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

## 4.2 吸光度の図示

主解析および副次解析における施設・時期ごとの陽性対照群と溶媒群の吸光度を図3, 4に示す。

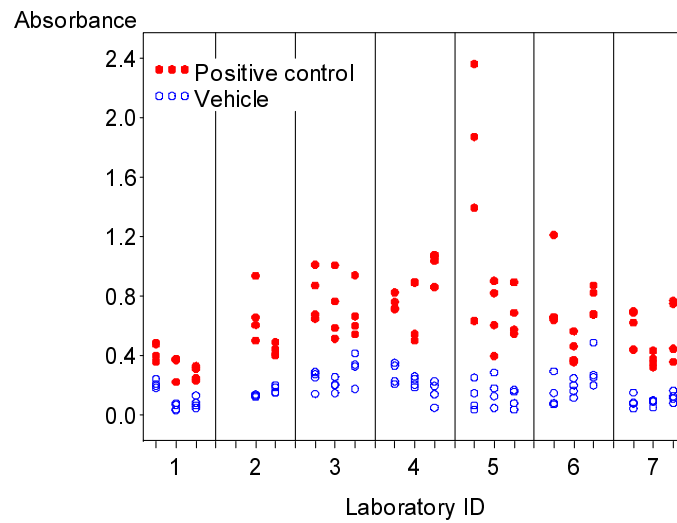


図 3: 陽性対照群と溶媒群の吸光度のプロット (主解析: 採否 (2))

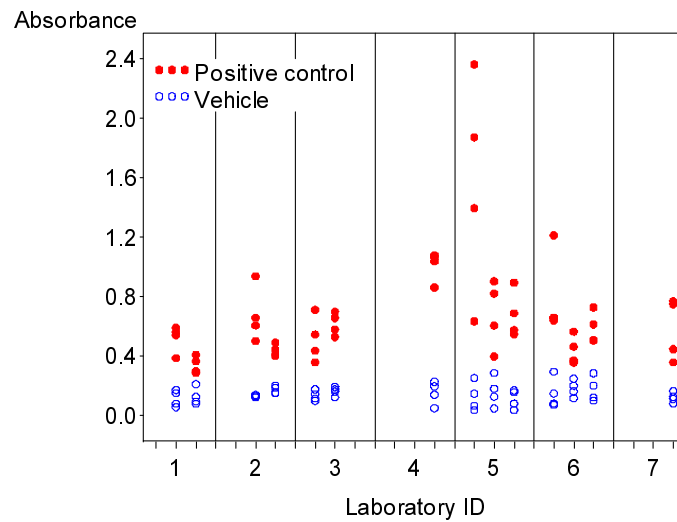


図 4: 陽性対照群と溶媒群の吸光度のプロット (副次解析: 採否 (1))

## 5 被験物質の結果（主解析）

### 5.1 SI 値とその 95%信頼区間

主解析における各被験物質の SI 値とその 95%信頼区間を図 5, 6 に示す。図中の「WA」は SI 値の重み付き平均を表す。被験物質ごとに縦軸のスケールが異なることに注意する。個別の数値を表 19 ~ 28 を示す。本バリデーション研究では、濃度依存的に正の傾きで SI 値が 2 を超えるとき、陽性と判定する。被験物質ごとの最終的な判定は、重み付き平均の結果に基づいて判定する<sup>2</sup>。

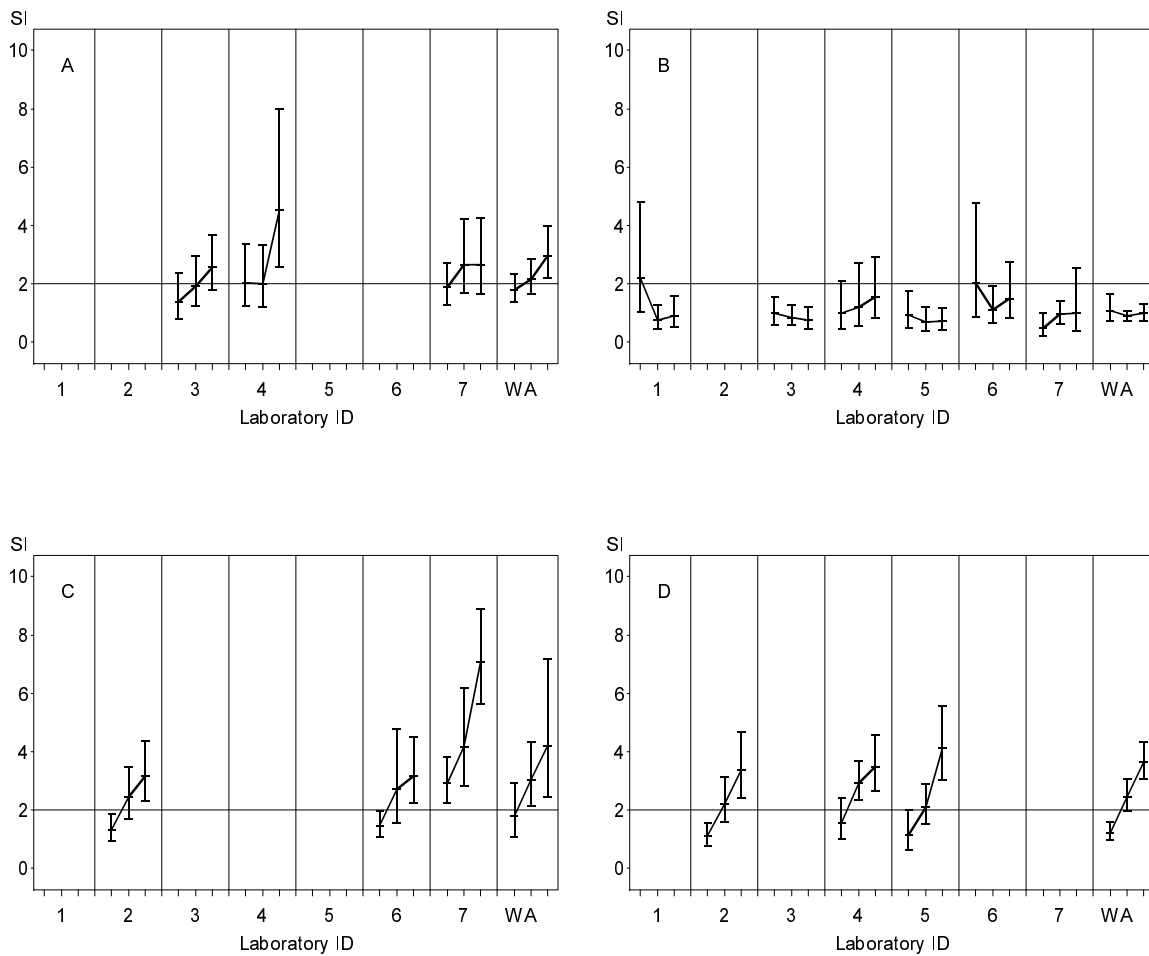


図 5: SI 値の用量反応関係（被験物質 A ~ D）

<sup>2</sup>2008 年 7 月 3 日 LLNA-BrdU バリデーション研究打ち合わせメモ参照

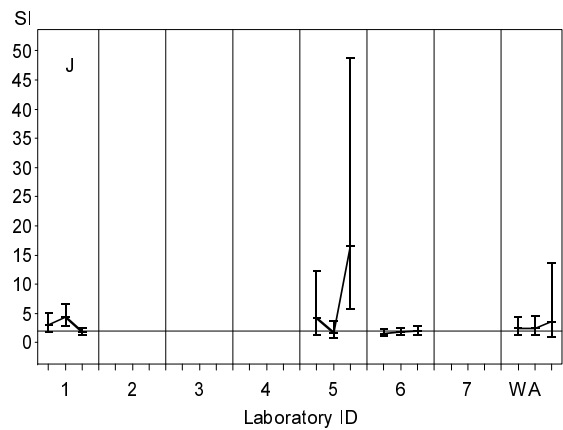
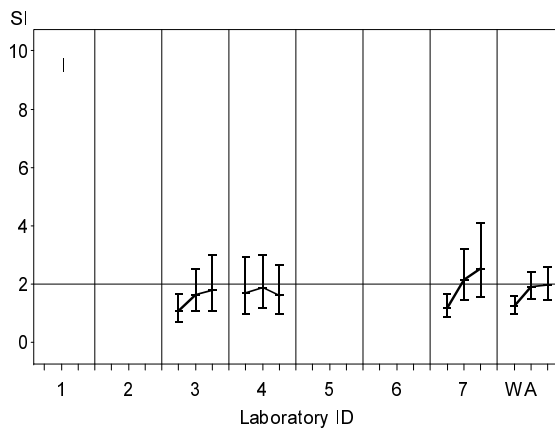
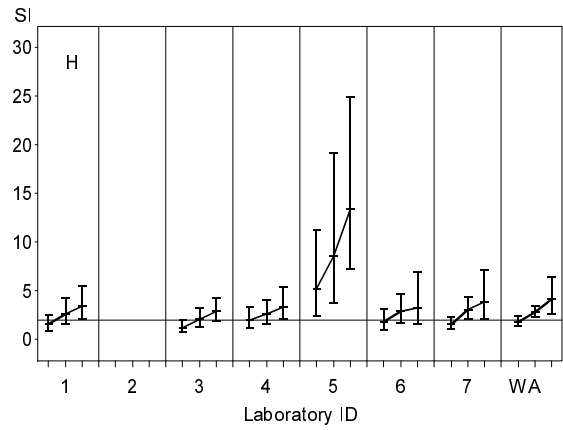
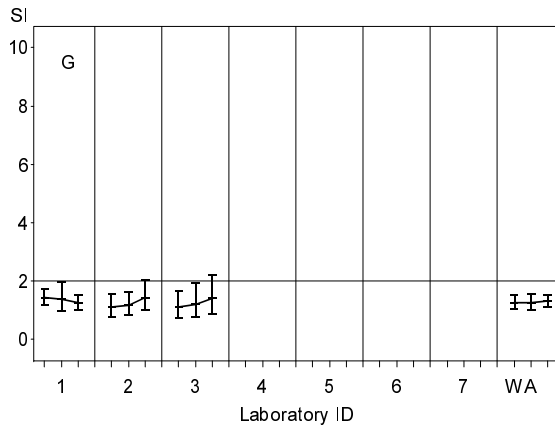
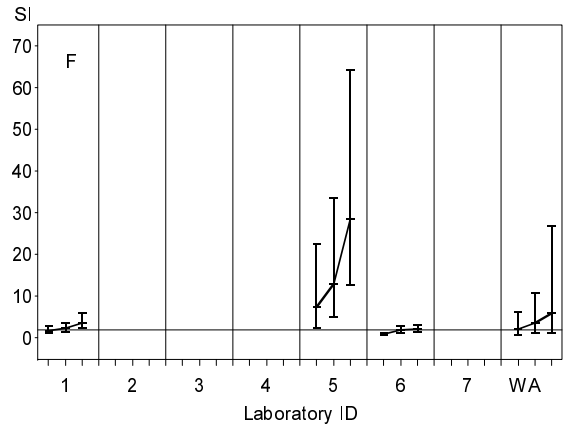
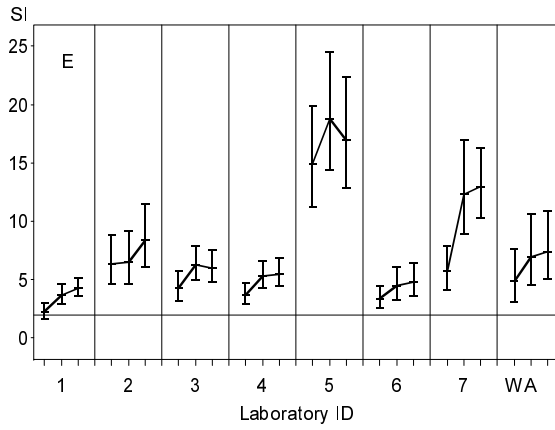


図 6: SI 値の用量反応関係 (被験物質 E ~ J)

表 19: 被験物質 A

Mean absorbance and SI value (SI_sub_A.txt)								
25JUL2008:16:32:31								
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

表 20: 被験物質 B

Mean absorbance and SI value (SI_sub_B.txt)								
25JUL2008:16:32:31								
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

表 21: 被験物質 C

Mean absorbance and SI value (SI_sub_C.txt)								
25JUL2008:16:32:31								
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

表 22: 被験物質 D

Mean absorbance and SI value (SI_sub_D.txt)								
25JUL2008:16:32:31								
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

表 23: 被験物質 E

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	95%CI 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

表 24: 被験物質 F

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	95%CI 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

表 25: 被験物質 G

Mean absorbance and SI value (SI_sub_G.txt)								
25JUL2008:16:32:31								
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

表 26: 被験物質 H

Mean absorbance and SI value (SI_sub_H.txt)								
25JUL2008:16:32:31								
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



表 27: 被験物質 I

Mean absorbance and SI value (SI_sub_I.txt)								25JUL2008:16:32:31
Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	95%CI 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

表 28: 被験物質 J

Mean absorbance and SI value (SI_sub_J.txt)								25JUL2008:16:32:31
Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	95%CI 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

## 5.2 リンパ節重量と吸光度の関係

主解析におけるリンパ節重量と吸光度の散布図を図7, 8に示す。

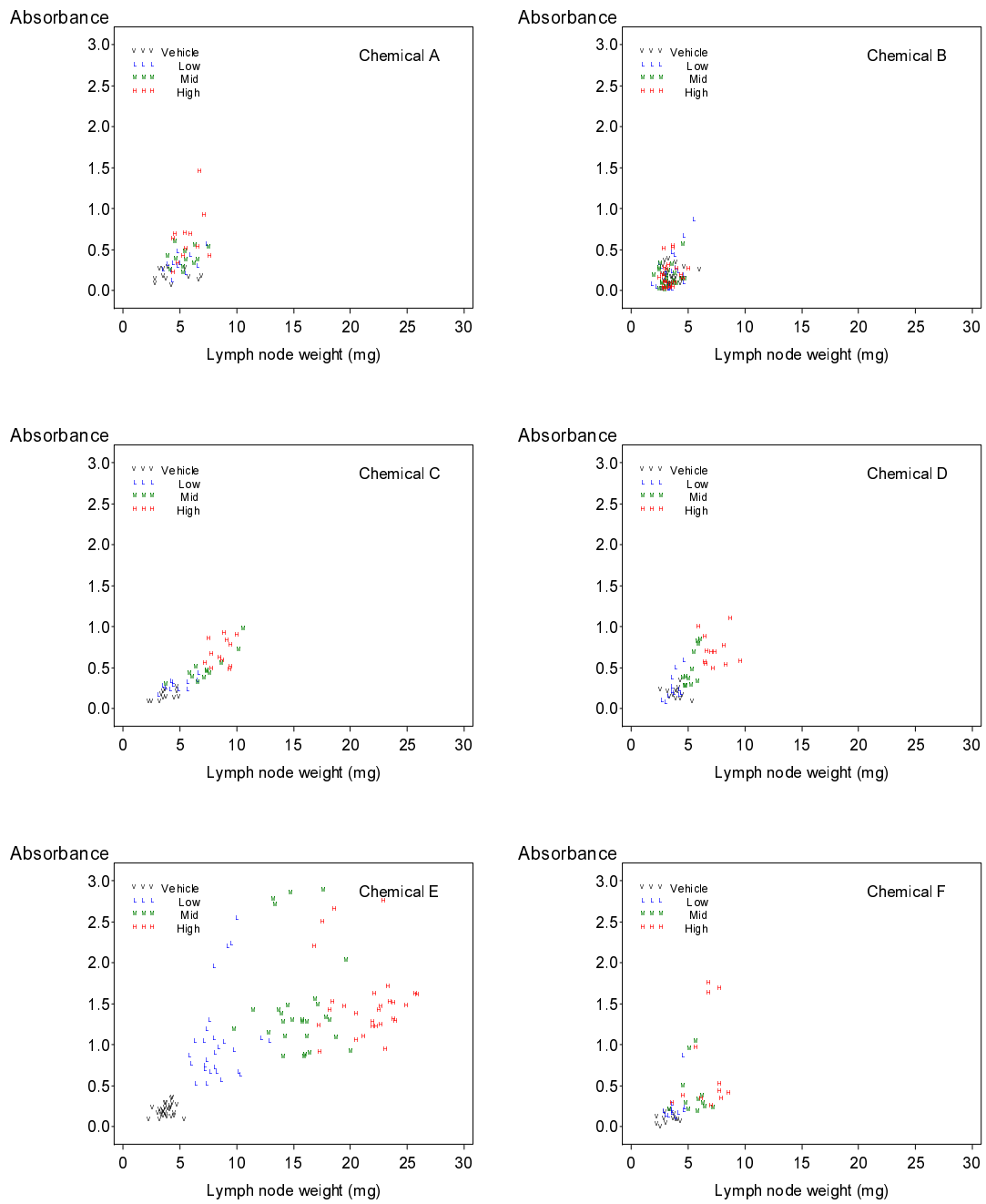


図7: リンパ節重量と吸光度の関係 (被験物質 A ~ F)

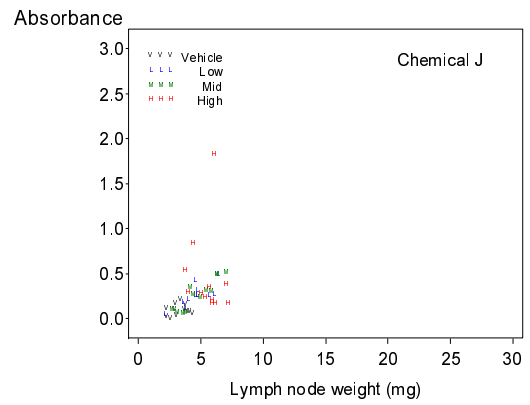
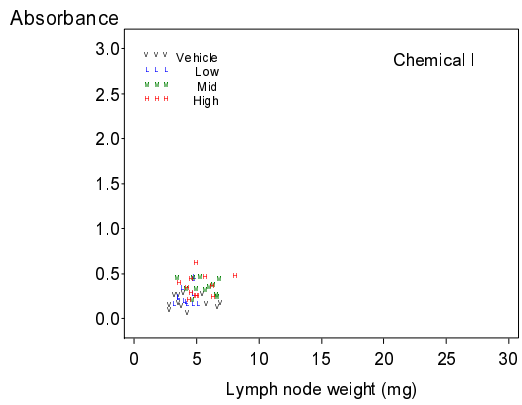
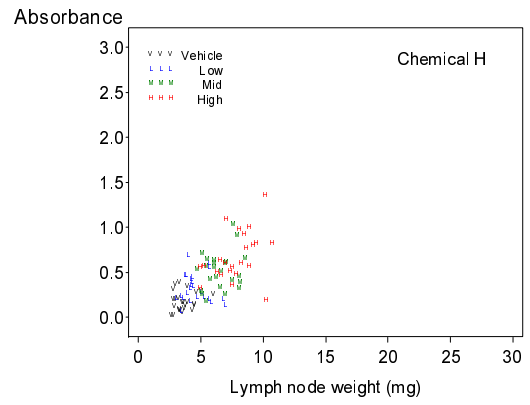
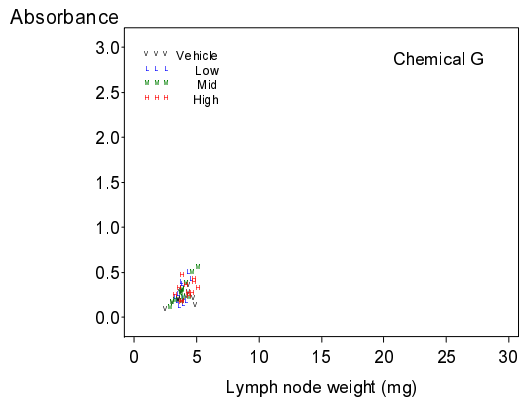


図 8: リンパ節重量と吸光度の関係 (被験物質 G~J)

# 皮膚感作性試験代替法（LLNA-BrdU 法）バリデーション研究計画書 Version 1.0

2006年7月3日 作成者 小島 肇

## 0．まえおき

本研究は，日本動物実験代替法学会（本学会）バリデーション委員会が実行委員会を組織して行うものである．

研究遂行中に本計画書の内容を変更したときは，その度ごとに改訂日，改訂内容，改訂責任者を本計画書に追記する．

## 1．研究目的

本研究の目的は，皮膚感作性試験代替法の LLNA-BrdU 法 で得られる皮膚感作性の判定が，被験物質遮蔽下で、複数の施設間でどの程度一致するか（施設間再現性），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），という2課題について，多施設の実験を通して評価を行うことである．

## 2．実行組織

本組織の正式名称を「LLNA-BrdU 法バリデーション研究実行委員会」とし，連絡等での略称は「LLNA-BrdU バリ実行委」とし，本計画書内では単に「本実行委」とする．

本実行委は次の委員で構成する．

- 1 ) 実験参加施設代表：実験参加施設から各1名
- 2 ) バリデーション委員会委員：若干名
- 3 ) 技術担当として必要な委員：若干名

実際の委員は，それぞれの組織からの推薦に基づいて本学会バリデーション委員会が任命し，資料1「LLNA-BrdU法バリ実行委名簿」に記しておく．任命理由及び時点は記録に残す．

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」班の協力を得る．

本実行委では以下の役割の担当者を本実行委の内あるいは外から委嘱し，その氏名を資料1内に記しておく．

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-BrdU 法の内容，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：被験物質候補（資料2）より研究に用いる被験物質を選定する．

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・配布の手配を行う．

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、試料等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。

### 3．LLNA-BrdU 法の実験手順

実験担当者は、資料3「LLNA-BrdU法プロトコール」にもとづいて本実行委が作成した資料4「LLNA-BrdU法バリ研究実験SOP」に従って、本実行委が用意あるいは指定した試料・資材を用いて、LLNA-BrdU 法による被験物質の評価実験を行う。

### 4．研究日程

本学会バリデーション委員会は2006年7月3日に、第1回実行委員会を開催して実験参加施設を確定し、委員と研究計画書を決定し、本実行委を発足させ、以後の研究遂行を本実行委に委任する。本実行委は2006年7月中旬に、別に述べる日程で技術研修を実施する。

実験担当者は2006年8月18日までに各施設で予備実験を行い、本研究計画書及び、LLNA-BrdU 法実験SOPの改訂についての意見を実行委員長に提出する。本実行委はこれらの意見に基づいて、8月22日の第2回実行委員会で、本研究計画書とLLNA-BrdU 法実験SOPの改訂を行う。

被験物質割付担当者は2006年8月31日までに被験物質の割付を行い、結果を試料等手配担当者に報告する。試料等手配担当者は被験物質割付の結果に従い被験物質をコード化した後、実験実施日程に合わせて資材とともに被験物質を実験参加施設に送付する。

実験担当者は2006年10月より実験を開始し、2007年1月10日までに実験結果をデータ解析担当者に報告する。

本実行委は2007年1月に中間報告会を開催する。

本実行委は2007年2月末までに報告書をまとめる。

本実行委は2007年3月にLLNA-BrdU 法のバリデーション研究の報告書を本学会バリデーション委員会に提出する。

### 5．実験参加施設

実験参加施設は次の条件を満たすものとする。

- (1) 本実行委に本学会会員を施設代表（参加施設代表者）として参加させる。
- (2) 実験において施設に求められる機材等（動物飼育施設等）を用意できる。
- (3) 実験担当者に技術研修を受けさせる。

実験参加施設は参加施設代表者もしくは実験担当者の中から実験について責任を負う実験責任者をおく。

### 6．被験物質

被験物質選定担当者は、資料2「被験物質候補のリスト」から、既知データに基づいて、皮膚感作性の程度のバランスを考慮して被験物質を選定し、選定結果を被験物質割付担当者に知らせる。被験物質としては、なるべく既知データが豊富で、LLNA の実験結果が存在するものを採用する。被験物質割付担当者は割付のデザインを作成し、試料等手配担当者に知らせる。試料等手配担当者は被験物質割付担当者のデザインに基づいて、実験担当者に被験物質が何であるかわからないようにコード化して、関連試料と共に実験参加施設に送付する。

#### 7. 被験物質の実験参加施設への割付

被験物質割付担当者は、表1に概念的に示すように、被験物質選定担当者により選択された被験候補物質の中の3物質を標準被験物質とし全参加施設に、その他の被験物質については、バランスを考慮して一部の施設に割り付ける。被験物質コードと実験参加施設への割付、被験物質溶液の調製・配布は、試料・機器手配担当者が行ってその記録を管理する。

表1 被験物質の割付方針の概念図

	参加施設A	参加施設B	参加施設C	...
標準被験物質 1				
標準被験物質 2				
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				
...				...

#### 8. 実験動物，機器，被験物質試料の準備

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

動物手配担当者は、各実験施設と打ち合わせを行い、動物送付の手配を行う。

#### 9. 経費

本実行委に参加するための旅費は自弁とする。

本実行委が送付するもの以外の、実験器具・消耗品の費用は、各実験参加施設が負担する。ただし、実験用動物購入の費用は半額を本実行委が負担する。

#### 10. 技術研修と予備実験

本実行委は2006年7月11,12日に国立医薬品食品衛生研究所(用賀)で技術研修を実施する。実験担当者は、この技術研修を受けなければならない。

技術研修を終わった実験担当者は、自施設で溶媒及び陽性対照物質について予備実験を行い、結果をデータ解析担当者に送付する。

データ解析担当者は、送付されたデータを速やかに検討し、8月22日の第2回実行委員会で検討結果を本実行委に報告する。実行委員長は、第2回実行委員会での検討結果に基づいて、本実験に進むことについての結論を出し、実験参加施設に通知する。実行委員長は、実験遂行中に計画変更の必要が生じた場合、直ちに、対面あるいはメールでの実行委員会を招集し、計画変更を審議し、滞りない進行を図るものとする。

## 11. データ管理

実験担当者は、以下の記録・結果を所定の記録用紙に記録する。

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

実験担当者または実験参加施設代表者は、記録用紙の情報を所定の電子ファイルに転載し、電子ファイル、および記録用紙のコピーをデータ解析担当者に送付する。記入要領は技術研修会で担当者が説明する。

本実行委の委員長は、各施設から送られてきたGLP準拠の記録のコピー、データベース、データ解析結果等を、バリデーション研究の成果が社会的に承認されたと本学会バリデーション委員会が判断するまで、国立医薬品食品衛生研究所（現時点では、安全性生物試験研究センター、薬理部、新規試験法評価室）に、研究終了後5年が過ぎるまで保管する。

## 12. データ解析

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

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

- (1) 標準被験物質と陽性対照物質のSI値及び指定したSI値を与える濃度の施設間ばらつきの評価
- (2) 過去の生体での実験結果との比較における、感度・特異度・一致度の評価

データ解析担当者は、データ解析の結果を中間報告会及び最終報告会で報告する。

## 13. 中間報告会

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

#### 14. 結果の公表

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

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

#### 15. 各種問い合わせ先

実験技術とSOP：武吉正博「[takeyoshi-masahiro@ceri.jp](mailto:takeyoshi-masahiro@ceri.jp)」

被験物質，試料，共通消耗品：小島肇「[h-kojima@nihs.go.jp](mailto:h-kojima@nihs.go.jp)」

データシートとその送付：寒水孝司「[sozu@medstat.med.osaka-u.ac.jp](mailto:sozu@medstat.med.osaka-u.ac.jp)」

計画書，報告書，その他一般事項：小島肇「[h-kojima@nihs.go.jp](mailto:h-kojima@nihs.go.jp)」

実験動物の入荷等：出原賢治「[kn\\_idehara@daicel.co.jp](mailto:kn_idehara@daicel.co.jp)」

以上



## 0. まえおき

本研究は、日本動物実験代替法学会（本学会）バリデーション委員会が実行委員会を組織して行うものである。

研究遂行中に本計画書の内容を変更したときは、その度ごとに改訂日、改訂内容、改訂責任者を本計画書に追記する。

## 1. 研究目的

本研究の目的は、皮膚感作性試験代替法の LLNA-BrdU 法 で得られる皮膚感作性の判定が、被験物質遮蔽下で複数の施設間でどの程度一致するか（施設間再現性）、LLNA-BrdU 第1次バリデーション実験の改善が妥当に行われたか、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）という3 つの課題を、多施設での実験を通して評価することである。

## 2. 実行組織

本組織の正式名称を「LLNA-BrdU 法バリデーション研究第2次実行委員会」とし、連絡等での略称は「LLNA-BrdU バリ第2次実行委」とし、本計画書内では単に「第2次実行委」とする。

第2次実行委は次の委員で構成する。

- 1) 実験参加施設代表：実験参加施設から各1 名
- 2) バリデーション委員会委員：若干名
- 3) 技術担当として必要な委員：若干名

実際の委員は、それぞれの組織からの推薦に基づいて本学会バリデーション委員会が任命し、資料1「LLNA-BrdU バリ第2次実行委リスト」にリストアップしておく。決定の理由及び時点は記録に残す。

研究遂行においては、小島 肇が主任研究者を務める厚生労働科学研究「動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究」班の協力を得る。

第2次実行委では以下の役割の担当者を第2次実行委の内あるいは外から委嘱し、その氏名を資料2「LLNA-BrdU バリ研究第2次担当者リスト」に残す。

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-BrdU 法の内容、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。ただし、用いる物質はLLNA-DA法の被験物質と同様にする。

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：第2次実行委に所属し、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。

### 3. LLNA-BrdU 法の実験手順

実験担当者は、本書：資料4「LLNA-BrdU 法第2次研究計画書」にもとづいて第2次実行委が作成した資料5「LLNA-BrdU 法第2次実験SOP (Version 0.1)」に従って、第2次実行委が用意あるいは指定した試料・資材を用いて、LLNA-BrdU 法による被験物質の評価実験を行う。

### 4. 研究日程

本学会バリデーション委員会は2006年8月23日に、実験参加施設を確定し、委員と研究計画書を決定し、東京にて委員会を発足させ、以後の研究遂行を第2次実行委に委任する。実験担当者は2006年11月末日までに各施設で実験を行う。

被験物質割付担当者は2006年9月中旬までに被験物質の割付を行い、結果を試料等手配担当者に報告する。試料等手配担当者は被験物質割付の結果に従い被験物質をコード化した後、実験参加施設の実験実施日程に合わせて資材とともに被験物質を実験参加施設に送付する。

実験担当者は2007年10月初旬より実験を開始し、2006年12月末までに実験結果をデータ解析担当者に報告する。第2次実行委は2008年1～2月に2次実験の中間報告会を開催する。第2次実行委は2008年3月末までに報告書をまとめ、第2次バリデーション実験遂行についての検討を行う。この検討ではSOPを見直し、必要に応じてその改定を行う。

第2次実行委は2008年4月にLLNA-BrdU 法のバリデーション研究の報告書を本学会バリデーション委員会に提出する。

### 5. 実験参加施設

実験参加施設は次の条件を満たすものとする。

- (1) 第2次実行委に本学会会員を施設代表（参加施設代表者）として参加させる。
- (2) 実験において施設に求められる機材等（動物飼育施設等）を用意できる。
- (3) LLNA-BrdU 法の第1次バリデーション実験に参加した施設
- (4) 6被験物質を担当できる施設

実験参加施設は参加施設代表者もしくは実験担当者の中から実験について責任を負う実験責任者をおく。

### 6. 被験物質

被験物質選定担当者は資料3「被験物質候補のリスト」から、既知データに基づいて、皮膚感作性の程度のバランスを考慮して被験物質を選定し、選定結果を被験物質割付担当者に知らせる。被験物質としては、なるべく既知データが豊富で、LLNAの実験結果が存在するものを採用する。被験物質割付担当者は割付のデザインを作成し、試料等手配担当者に

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

#### 7. 被験物質の実験参加施設への割付

被験物質割付担当者は、表1に概念的に示すように、被験物質選定担当者により選択された被験候補物質の内の2物質を標準被験物質とし全参加施設に、その他の被験物質については、バランスを考慮して一部の施設に割り付ける。被験物質コードと実験参加施設への割付、被験物質溶液の調製・配布は、試料・機器手配担当者が行ってその記録を管理する。

表1 被験物質の割付方針の概念図

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

#### 8. 実験動物、機器、被験物質試料の準備

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

動物・機器手配担当者は、各実験施設と打ち合わせを行い、動物の手配を行う。

#### 9. 経費

第2次実行委に参加するための旅費は自弁とする。

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

#### 10. 技術研修と予備実験

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

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

#### 11. データ管理

実験担当者は、以下の記録・結果を所定の記録用紙に記録する。

(1) 被験物質、溶媒、陽性対照物質溶液

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

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

## 12. データ解析

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

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

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

## 13. 中間報告会

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

## 14. 結果の公表

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

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

## 15. 各種問い合わせ先

実験内容とSOP：武吉正博「[takeyoshi-masahiro@ceri.jp](mailto:takeyoshi-masahiro@ceri.jp)」

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

データシートとその送付：寒水孝司「[sozu@ac.jp](mailto:sozu@ac.jp)」

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

以上

## 標準操作手順書 (Local lymph node assay-BrdU 法)

Local lymph node assay (LLNA) は初回抗原刺激によるリンパ球の増殖反応を指標とする化学物質の感作性をスクリーニング手法(感作性試験)の一つであり、従来の手法に比べ短期間に化学物質のアレルギー性を検出することが可能となる。

本手順書は Bromodeoxyuridine (BrdU)を使用する Non-RI LLNA 法 (BrdU 法) の手順について記載する。

以下に標準的な実験プロトコルを示す。

## 1. 動物

### 1.1 使用動物

通常は未妊娠あるいは未経産の 8 週令から 12 週令雌 CBA/JN (日本チャールス・リバー株式会社)を用いる。

### 1.2 動物種選択の理由

CBA/JN は ICCVAM peer review report 及び OECD TG429 において推奨されている CBA/J の亜系統であるため。

### 1.3 検疫・馴化・群分け

動物は入荷後、5 日間以上期間検疫・馴化を行い、期間中順調に発育し健全と確認されたマウスを用いて、群分けを行う。

### 1.4 動物の識別

動物は油性インキによる尾へのマーキング等の適切な方法による識別を行う。

## 2. 飼育管理及び飼育環境

温湿度は  $21 \pm 3$ 、30-70%、明暗サイクルは 12 時間ごと(明:12 時間、暗:12 時間)とする。給餌及び給水は自由摂取とする。

## 3 群構成

基本的な群構成として、被験物質群に低用量、中用量及び高用量を設け、媒体対照群及び陽性対照群を設ける。

## 4. 調製

### 4.1 媒体

アセトンとオリーブ油を 4:1 (v/v)の割合で混和したものとアセトン-オリーブ油混液(AOO)が媒体としては最も適している。

その他に、優先順位としてジメチルホルムアミド(DMF)、メチルエチルケトン(MEK)、プロピレングリコール(PG)及びジメチルスルホキシド(DMSO)等の有機溶媒を用いることができるが、溶媒の選択は予備実験を実施し最も高濃度で溶解或いは良好に懸濁可能なものを選択する。

#### 4.2 被験物質及び陽性対照物質

調製濃度は溶解性を基準に適切な媒体を選択し、可能な限り高濃度での実験を行うことが望ましい。被験物質及び陽性対照物質の調製は上記媒体を用いて所定の濃度(0.1%, 1%, 10%, 50%等)に調製する。

陽性対照物質としては50%  $\alpha$ -hexylcinnamic aldehyde (HCA)、10% Isoeugenol、1% 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)等を用いることが出来る。

#### 4.3 BrdU

BrdU (Nacalai tesque 製等)は注射用生理食塩液(大塚製薬工場製等)を用いて10mg/mlになるように調製し、完全に溶解した後、濾過滅菌を行う。使用当日に調製することが望ましいが、事前に調製する場合には、調製物を使用日まで-20℃以下で凍結保存し、投与日に解凍して使用する。

### 5. 感 作

#### 5.1 感作手順

- 1) 保定者は、薬指と小指で尾をはさみ、親指と人差し指で頭部を保定し(気道は必ず確保する)、耳介を広げて保定する。

図(マウス保定)

- 2) 実験者は、マイクロピペッターを用いて耳介にそれぞれ25  $\mu$ Lずつ塗布する。
- 3) 塗布量は25  $\mu$ Lと少量であるが、流れ落ちないように注意し、数回に分けて塗布を行う。尚、保定及び投与は一人で行うことも可能である。

#### 5.2 投与回数及び時刻

毎日、ほぼ一定の時刻に1日1回、3日間反復適用する。

### 6. BrdU の投与

注射針と注射筒(テルモ株式会社等)を用いて0.5 mL/匹を最終感作の約48時間後に1回腹腔内投与する。

## 図(被験物質投与)

### 7. 耳介リンパ節の採取

- 7.1 BrdU 投与の約 24 時間後にマウスを頸椎脱臼によって安楽死させた後、仰臥位にし下顎から頸部まで 70%エタノールで消毒する。
- 7.2 下顎から頸部まで正中線に沿って切皮後、皮下組織を剥離し、耳介下まで露出させる。
- 7.3 耳の直下に耳介リンパ節があるので注意深く探し、採取する。

## 図(リンパの位置)

- 7.4 耳介リンパ節には余分な脂肪組織がつかないように丁寧に取り除く。
- 7.5 採取した耳介リンパ節における BrdU 取り込み量を後日測定する場合は、重量測定後各個体毎の耳介リンパ節を識別した後、-20 以下で凍結保存する。

### 8. BrdU 取り込み量の測定

#### 8.1 材料及び使用機器

- ペレットペッスル付 1.5 mL チューブ (下図参照)  
Pestles & Tubes (BEL-ART PRODUCTS Cat No. 19923-0000)

#### 図 (ペレットペッスル付チューブ)

- ナイロンメッシュ (セルストレーナ、ファルコン #REF352350 (70 $\mu$ m, 225 メッシュ))
- 20 mL プラスチック容器
- 50 mL 遠心管
- 96 well ELISA 用マイクロプレート
- 蒸留水
- 生理食塩液
- 測定キット (Roche Applied Science 社製 Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)、Cat No. 11647229001)
- 遠心機(300 × G 程度でマイクロプレートの遠心操作が可能なもの。)
- マイクロプレートリーダー (370-492nm 或いは 450nm-650nm の測定が可能なもの)

#### 8.2 試薬の調製

##### 1) Anti-BrdU-POD 液

Anti-BrdU -POD stock solution (Anti-BrdU-POD (バイアル)に 1.1 mL の蒸留

水を加え、10 分間放置後、十分に混ぜる)を Antibody dilution solution で 100 倍希釈する。

2) Washing solution 液

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

3) 1M 硫酸 (反応停止液を使用する場合)

市販の濃硫酸を蒸留水で希釈し、1M 溶液を調製する。

### 8.3 前処理 (細胞浮遊液の調製)

- 1) カップに生理食塩液を 15 mL 用意する。
- 2) リンパ節の入った 1.5 mL チューブに 300-500  $\mu$ L 生理食塩液を入れペレットペッスルでつぶしながらリンパ球を分散させる。
- 3) 50 mL のチューブにナイロンメッシュを取り付け、懸濁液を濾した後、パスツールピペット等を用いて使い残りの生理食塩液で洗いこむ。

\*上記の方法の他、2 枚のスライドガラスのスリ部分を利用して物理的に破碎・懸濁させることも出来る。但し細胞懸濁液の最終容量は 15 mL となるようにする。

### 8.4 測定準備及び測定

- 1) 細胞浮遊液を均一に分散させた後 96 well プレートに 100  $\mu$ L 分注する (N=3)。
- 2) 分注したプレートを 300 $\times$ G、10 min 遠心する。
- 3) 上清を吸引除去する。  
\*この際、全量の 3/4 程度を吸引する。全量近くを吸引すると細胞も同時に吸引され、バラツキの原因となる。
- 4) 温風式乾燥機で 20 min 乾燥させる (乾燥中はマイクロプレートのふたはかぶせない)。

### 写真 (実施例)

- 5) マイクロプレート底面が完全に乾燥していることを確認した後、Fix Denat (測定キットに含まれる)を 200  $\mu$ L 添加し 30 min 静置する。
- 6) Fix Denat を捨て、ペーパータオルの上で水分を取る。
- 7) Anti-BrdU-POD 液を 100  $\mu$ L 添加し室温で 1 時間放置する。
- 8) Anti-BrdU-POD 液を捨てペーパータオルの上で水分を取る。
- 9) Washing solution 液を 200  $\mu$ L 添加し、プレートの中でピペッティング後(10 回/well)、液を捨てる操作を 3 回繰り返す。
- 10) Washing solution 液を捨てペーパータオルの上で水分を取る。
- 11) TMB 発色基質を 100  $\mu$ L 添加し暗所(机の引出し等)に入れ、15 min 放置す



る。

\* 反応時間は 5-30 分の間で適当な時間に設定可能であるが、十分に呈色反応が進行する時間に設定する。

- 12) 放置後、マイクロプレートリーダーで 370nm を測定波長、492nm を参照波長として 2 波長測定を行う。

\* マイクロプレートリーダーのフィルターの関係等で 490 nm を測定波長とする場合は反応停止液 (1M 硫酸) を 1 ウェル当たり 2 $\mu$ L 添加した後、650 nm を参照波長として 2 波長測定を行う。

#### 8.5 測定に用いなかった試料の保管

- 1) 細胞懸濁液はそのまま冷所にて 24 時間は保存、再測定が可能である。

#### 9 結果の評価

各個体の BrdU 測定値の平均値を算出した後、陰性対照群の平均値を算出する。各個体の BrdU 測定値の平均値を陰性対照群の平均値で除した数値 (Stimulation Index、SI) を算出した後、各用量群の平均 SI 値及びその標準偏差及び標準誤差を算出し、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。

#### 参考文献

Takeyoshi, M., Yamasaki, K., Yakabe, Y., Takatsuki, M. and Kimber, I., 2001. Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. Toxicology Letters 119, 203-208

# LLNA-BrdU 法実験 SOP

(Version 1.01)

改訂 070826

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

被験物質数や動物数が変わるときは、この手順での関連部分を変更して適用する。

## §0 実験前の機器・器具の準備

表 1 に示す実験機器・器具、試薬を用意する。

## §1 マウス入荷のための準備

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

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

第 1 群：「A00」

第 2 群：「陽性対照」

第 3 群：「溶媒」

第 4 群：「被験物質 Y 低濃度」

第 5 群：「被験物質 Y 中濃度」

第 6 群：「被験物質 Y 高濃度」

第 7 群：「被験物質 X 低濃度」

第 8 群：「被験物質 X 中濃度」

第 9 群：「被験物質 X 高濃度」

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

## §2 入荷、馴化、群分け

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

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

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

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

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

### § 3 機器・器具、試薬、試験液の確認と保管

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

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

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

### § 4 試験液の調製

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

### § 5 感作操作 (第 1,2,3 日目の操作)

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



図1 マウスの保定と耳介の保持

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

## §6 BrdU 溶液の調製

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

## §7 BrdU の投与（第5日目の操作）

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

## §8 耳介リンパ節の採取

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

Figure 1: Lateral Dissection

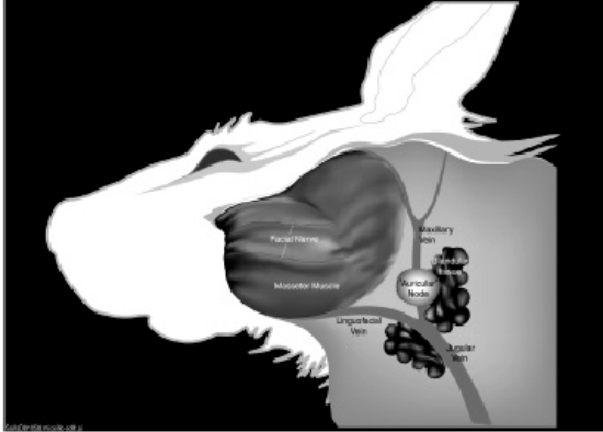


Figure 2: Ventral Dissection

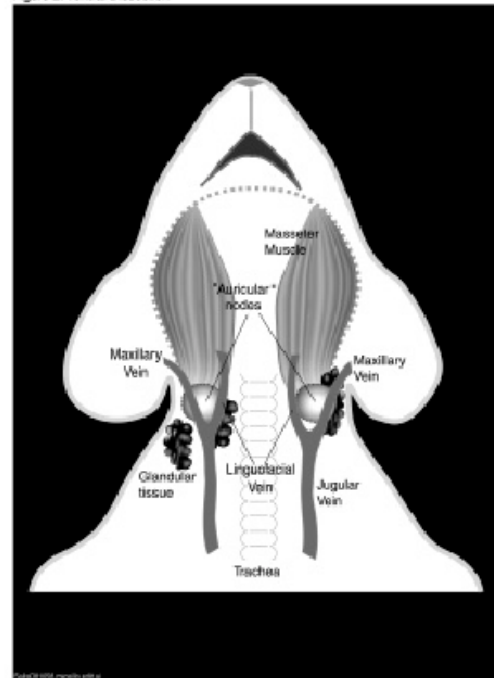


図2 耳介リンパ節の解剖学的位地

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

## § 9 BrdU 取り込み量の測定

### 9.1) キット試薬の調製

#### 1) Anti-BrdU-POD 液

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

#### 2) Washing solution 液

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

#### 3) 1M 硫酸

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

### 9.2) 細胞浮遊液の調製

1) プラスチック容器に生理食塩液を 15 mL 用意する。(生理食塩液の容量は実施施設で事前に至適条件を検討の後、変更することが出来るが、陰性対照ウェルの吸光度が 0.1-0.2 となる条件を採用する。ここでは 15 ml にメスアップする場合の手順について記載する。)

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

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

注1：2枚のスライドガラスのスリ部分を利用して物理的に破碎・懸濁させてもよいが、その場合も細胞浮遊液の最終容量は15 mLとなるようにする。

注2：リンパ節は、採取後凍結保存して2週間以内に解凍して測定を実施する。

### 9.3) 測定準備及び測定

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

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

### 9.4) 測定に用いなかった細胞浮遊液の保管

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

差し支えない。

#### 9.5)実験の成立条件

プレート毎に陰性対照ウェルの吸光度が0.1-0.2の範囲にあることを実験の成立条件とする。A00群または溶媒群の平均吸光度が0.2を超えた場合には細胞浮遊液を更に希釈後、再測定を行う。なお、予め数段階の希釈懸濁液（15ml 懸濁液を生理食塩液で2倍、3倍等に希釈した浮遊液）を調製し、同時に測定を行っても構わないが、その際には実験成立条件を満たす1データのみを採用することとする。

#### § 10 データの入力及び担当者への送付

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

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

#### § 11 参考文献

Takeyoshi, M., Yamasaki, K., Yakabe, Y., Takatsuki, M. and Kimber, I. (2001). Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicology Letters* **119**, 203—208

表1 実験機器・器具、試薬リスト

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

実行委からの送付物

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

			る
BrdU (5-Bromo-2'deoxyuridine)	1 本	ナカライテスク株式会 社	05650-11 (1g)
濾過滅菌用フィルター	5 個	ミリポア	MILLEX-HV