

LLNA-DA 法バリデーション研究 (第 2 実験)

報告書

Version 1.1

報告書作成日：2007 年 6 月 27 日

報告書作成責任者： 大森 崇

LLNA-DA 法バリデーション研究実行委員

委員長

大森 崇（京都大学大学院医学研究科医療統計学分野）

委員

小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所薬理部）

寒水孝司（大阪大学臨床医工学融合研究教育センター）

吉村 功（東京理科大学工学部経営工学科）

出原賢治（ダイセル化学工業株式会社 評価・解析センター）

五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部）

金澤由基子（財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 医療用具試験室）

武吉正博（財団法人 化学物質評価研究機構安全性 評価技術研究所
研究第一部）

小坂忠司（財団法人 残留農薬研究所 毒性部）

浦谷 衛（石原産業株式会社 中央研究所 安全科学研究室 安全性グループ）

山中 淳（ピアス株式会社 中央研究所 ARI 評価グループ）

篠田伸介（株式会社 薬物安全性試験センター埼玉研究所 第二毒性部）

中村洋介（住友化学株式会社 情報電子化学業務室）

青儀 巧（大塚製薬株式会社 徳島研究所 安全性研究センター 第2研究室）

米田知史（トーアエイヨー株式会社 研究開発部 福島研究所）

花田智彦（日本新薬株式会社 創薬研究所 安全性研究部）

猪田健人（中野製薬株式会社 マーケティング本部研究）

田中正志（明治製菓株式会社 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）

宇佐美雅仁（ホーユ株式会社 総合研究所 基盤技術研究室）

篠田直樹（参天製薬株式会社奈良研究開発センター）

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

牧 栄二（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）

略号の原語または意味

略号	原語	意味
ACD	Allergic Contact Dermatitis	
ACE	Aceton	
AOO	Acetone/Olive Oil	
ATP	Adenosine triphosphate	
BT	Buehler Test	
EC3		The estimated concentration that yields a stimulation index of three
DMSO	dimethyl sulfoxide	
FCA	Freund's Complete Adjuvant	
GLP	Good Laboratory Practice	
GPMT	Guinea-Pig Maximization Test	
HCA	Hexyl Cinnamic Aldehyde	
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods	
LLNA	Local Lymph Node Assay	
OECD	Organization for Economic cooperation and Development	
PBS	Phosphate Buffered Saline	
RI	Radioactive Isotope	
SI	Stimulation Index	
SLS	Sodium Lauryl Sulfate	
SOP	Standard operating procedure	

目次

はじめに	6
要約	7
1. 背景	8
1.1 皮膚感作性	8
1.2 LLNA 法	8
1.3 LLNA-DA 法	8
1.4 本研究にいたるまでの過程	9
1.5 本研究の目的	10
2. 方法	11
2.1 組織と役割	11
2.2 LLNA-DA の操作方法	12
2.3 技術研修会	13
2.4 ルミノメータの校正	13
2.5 予備実験	13
2.6 被験物質	14
2.7 割付	14
2.8 試料等の配布	15
2.9 実験実施のスケジュール	15
2.10 データの管理	15
2.11 データベース	16
2.12 データ解析の方法	16
2.12.1 体重, リンパ節重量, ATP 発光量	16
2.12.2 一定の基準を満たす施設の選定方法	16
2.12.3 実施のしやすさの検討	17
2.12.4 SI 値とその 95%信頼区間の算出	17
2.12.5 施設内再現性、施設間再現性を評価する方法	18
2.12.6 ソフトウェア	18
3. 結果	19
3.1 研究の質について	19
3.2 選択された被験物質と割付け結果	19
3.3 データの取り扱いについて	20
3.4 背景基礎データ	22
3.4.1 体重	22
3.4.2 ATP 発光量	23
3.4.3 リンパ節重量と ATP 発光量の関係	25

3.5	LLNA-DA の分析感度	26
3.6	各被験物質の用量反応関係	27
3.7	施設間の再現性	29
3.8	施設内の再現性	30
3.9	一定の基準を満たす施設の選定と実施のしやすさ	31
3.9.1	提案施設の背景データ	31
3.9.2	実験実施施設が一定の基準を満たすかどうかの判定	32
3.9.3	実施しやすさの検討結果	33
4	考察	34
4.1	本研究の位置づけと意義	34
4.2	本研究で評価した LLNA-DA 法の操作上の特徴	35
4.3	本研究の妥当性	35
4.3.1	被験物質の選択	35
4.3.2	データの質に関して	36
4.3.3	施設内再現性	36
4.3.4	施設間再現性	36
4.3.5	LLNA-DA 法の実施のしやすさ	37
4.3.6	個々の被験物質に対する考察	37
4.4	第 1 実験から得られた結果を含めての考察	38
4.4.1	溶媒の ATP 発光量とリンパ節重量	38
4.4.2	物質 B : hexylcinnamic aldehyde	42
4.4.3	物質 E : cobalt chloride と物質 J : nickel sulfate	43
4.5	本研究の限界と今後の課題	44
5.	結論	44
	謝辞	45
	参考文献	46

はじめに

本報告書は、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会により組織された LLNA・DA 法バリデーション研究実行委員会が実施したバリデーション研究（第2実験）の報告書（Version 1.1）である。

この Version 1.1 では、当初作成された Version 1.0 についてバリデーション委員会から得たいくつかの意見を反映させた。Version 1.0 からの大きな変更点は、被験物質の調整日と投与日に関する記述の追記である。

要約

【目的】 local lymph node assay (LLNA 法) はマウスのリンパ節細胞増殖反応を ^3H -thymidine の取り込み量により皮膚感作性を評価する試験法であり、モルモットを用いた試験法 (GPMT/BT 法) の代替法として広く知られている。LLNA-DA 法は ^3H -thymidine の取り込み量の代わりに ATP 量を用いる方法であり、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。以前に LLNA 法の実施経験がある 10 施設で 12 被験物質を用いて実施したバリデーション研究では、AOO と ACE を溶媒とした 10 の被験物質で良好な結果が得られた。しかし DMSO を溶媒とした 2 つの金属塩では施設間差が大きくその原因が明らかにはならなかった。本研究では、1) 試験法の実施のしやすさの方法の構築とその評価ならびに 2) 金属の適用の可能性と溶媒としての DMSO を用いる物質の追加検討を行う目的で、7 実験実施施設による LLNA-DA 法のバリデーション研究を実施した。

【方法】 実験は本研究用に作成した LLNA-DA 法の standard operating procedure (SOP) に従い実施した。実験を行う前に、提案施設が主導となり技術研修会が実施された。被験物質として選定された 5 物質のうち、1 物質は以前に実施されたバリデーション研究の共通物質が選ばれ全 7 施設で実験を行い、残りの 4 物質は 4 施設ごとに実験を行った。この 4 物質は溶媒が DMSO のものが選ばれ、そのうち 3 物質が金属であった。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。判定基準は溶媒対照群の発光量に対する被験物質群の発光量の比 (stimulation index, SI 値) が 3 を超えた場合に陽性と判定した。また、提案施設の背景データに基づく「一定の基準を満たす施設」の基準を構築した。

【結果と考察】 実験を実施した 7 施設すべてで「一定の基準を満たす施設」であると判定された。また、全 7 実験実施施設で評価した 1 被験物質及び 4 実験実施施設で評価したその他の 3 被験物質については、施設間のばらつきは極めて小さく、すべての施設の判定が一致した。施設間で判定が一致しなかった 1 物質はどの施設でも高用量で SI 値は 3 付近であり、用量反応関係がみられた。

【結論】 7 実験実施施設による 5 被験物質の結果は、いずれも高い施設間再現性を示した。LLNA-DA 法は金属塩にも使用可能であるが、溶媒として DMSO を用いる場合塗布操作に注意する必要がある。良好な施設間再現性は事前に技術研修を適切に行ったことが大きな要因のひとつであると考えられる。

1. 背景

1.1 皮膚感作性

アレルギー性接触皮膚炎 (ACD; Allergic Contact Dermatitis) は、外部からの化学物質等 (抗原) が繰り返し接触し皮膚から吸収され、感作された T リンパ球による反応である IV 型アレルギーにより接触部位に一致して炎症反応をきたしたものをいう。ACD は産業で使用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と認識されている。

1.2 LLNA 法

近年、マウスを用いた感作評価方法として LLNA 法 (Local Lymph Node Assay) が開発され、現在までに多くの研究成果が広く報告されている (例えば Basketter and Scholes (1992), Basketter ら (2002), Haneke ら (2001))。また、この方法は Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) の安全性試験ガイドライン 429 としても承認されているだけでなく (OECD, 2002), Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) の Immunotoxicology Working Group によるプロトコールとしても推奨されている (ICCVAM, 2001)。

十分な性能をもつ *in vitro* の試験系が研究の段階であり実用化に至っていない現時点では、LLNA 法はモルモットを使った試験系に比べて動物愛護の面でも優れているとされている (OECD, 2002)。

LLNA 法は感作誘導期のリンパ節細胞増殖反応を ^3H で標識されたチミジンの DNA への取り込みを指標として皮膚感作性を評価する。しかし、我が国では Radioactive Isotope (RI) の取り扱い規制が厳しく、LLNA 法の普及が不十分であるといわれている。

1.3 LLNA-DA 法

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

1.4 本研究にいたるまでの過程

ダイセル化学工業（株）は、代替法に関する厚生労働科学研究班（主任研究者 大野泰雄）に評価を依頼するため LLNA-DA 法を新しい動物実験代替法として応募した。研究班ではこの方法が RI を用いないという利点以外にも簡便で、かつ時間のかからない方法であり、評価するに値する方法であると判断し、日本動物実験代替法学会評価委員会に評価を依頼した。その結果、LLNA-DA 法には複数の施設で実施されたバリデーション研究が必要とされ、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会の支援により、バリデーション研究を実施することとなった。

当初、動物実験代替法学会が参加施設を公募したところ、19 の実験実施施設がバリデーション研究の参加を希望した。しかし一度にこれだけの施設に動物および測定器の供給行うことが不可能であったために、実験実施施設としての参加施設を第 1 グループと第 2 グループに分け、2 つの研究を実施することとなった。グループ分けは、LLNA 法やそれに準じた試験法を実施した経験があることや日本動物実験代替法学会の評価委員会に委員が属すること等が基準とされた。これらの基準に該当した 10 施設を第 1 グループとし、先行する研究の実験実施施設となった。この研究を第 1 実験と呼ぶことにする。

開発された代替法が普及するためには、代替法の実施しやすさ (transferability) も重要な観点であることが指摘されている (OECD, 2005)。ここで、代替法の実施しやすさとは、一定の基準を満たす独立な施設により実施された代替法の実施結果が、正確で信頼できることである。第 2 グループの特徴は、LLNA 法やそれに準じた試験法を実施した経験がほとんどない施設が含まれていることであり、LLNA-DA 法の実施しやすさの検討を行うのに適していると考えられた。そこで、第 1 実験とは別に第 2 グループによる LLNA-DA 法の transferability の検討を行うことをひとつの目的にすることとし、バリデーション研究を実施することにした。以後、この研究を第 2 実験と呼ぶことにする。

第 1 実験では、遮蔽した 12 被験物質を用いて LLNA-DA 法の施設間再現性と代替可能性の検討が行なわれた。この結果、acetone/olive oil (AOO) と acetone (ACE) を溶媒した 10 被験物質については良好な施設間再現性が得られたが、dimethyl sulfoxide (DMSO) を溶媒とした 2 の金属塩 (nickel sulfate と cobalt chloride) については、施設間で結果の乖離が認められた。これら 2 つの金属の実験を行ったのは 3 施設であり、この 2 物質の溶媒は共通した DMSO の測定値が用いられているため、第 1 実験では DMSO に関する情報は多くなかった。このため、結果の乖離が、被験物質が金属の場合に LLNA-DA 法の実施が困難であることによるのか、溶媒である DMSO の扱いが困難であることによるのか、

または他の要因によるものであるのかは明確ではなかった。そこで、第 2 実験では、被験物質は DMSO を溶媒とした nickel sulfate と cobalt chloride を含む 4 物質の検討を行うことをもうひとつの目的とした。

また、第 1 実験と第 2 実験の結果がどの程度同じかどうかを知るために、第 1 実験で 10 施設が実施した hexylcinnamic aldehyde をすべての施設で実施した。

以上が本報告書で報告するバリデーション研究である。

1.5 本研究の目的

第 2 実験の目的は、遮蔽した被験物質を用いて、

- 1) 一定の基準を満たす施設の選定法の構築と構築された基準に基づく実施しやすさの検討ならびに一定の基準を満たすとされた施設での施設内再現性の検討、
- 2) nickel sulfate と cobalt chloride を含む DMSO を溶媒とした物質についての LLNA-DA 法の追加評価の検討

を行うことである。

2. 方法

本研究は、研究実施前に定められた研究計画書（資料 6）に従い実施された。

なお、研究計画書は第 1 実験が実施中に作成された。研究計画書が固定するまでに、第 1 実験の被験物質の開示は行われていなかったために、研究計画書の中に、上記の目的の 2 については具体的には明記されていない。

2.1 組織と役割

・研究の組織

本研究を遂行するための研究組織は、第 1 実験時と同じ LLNA-DA 法バリデーション研究実行委員会（以下、LLNA-DA バリ実行委）で構成された。構成員は以下のとおりである。

1) 実験施設代表者

日本動物実験代替法学会バリデーション委員会が組織した研究に参加の意志を示した実験施設の代表者。実験施設から各 1 名。

2) バリデーション委員会委員

日本動物実験代替法学会バリデーション委員会に属する数名。

3) 各実験実施施設の代表として必要な委員

各実験実施施設から数名。

当初、本研究の実験実施施設は 9 施設であったが、施設の都合により実験時期が合わない施設があり、7 施設が実験実施施設となった。

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

・各組織の役割

LLNA-DA バリ実行委は、いくつかの担当を設けた。担当とその役割は以下のとおりである。

実行委員長：研究組織と運営・進行を計画通りに行い、最終報告を作成する。

技術研修担当者：技術研修の準備を行い、LLNA-DA 法の内容、standard operating procedure (SOP)、記録用紙等の説明を行い、実技指導を行う。

被験物質選定担当者：資料 3「被験物質候補リスト」より、研究に用いる物質を選定する。このリストは第 1 実験と同じものである。

被験物質割付担当者：選定された被験物質を各施設に割り付けるための割付デザインを作成して試料等手配担当者に知らせ、研究結果が確定・公表さ

れるまで割付の根拠を保管する。

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

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

実験参加施設代表者：本実行委に所属し，実験参加施設を代表する。

実験担当者：技術研修を受け，試料・機器手配担当者から送付された試料等を用いて，SOP に従った実験を行い，実験結果をデータ解析担当者に送付する。

実験責任者：実験実施施設で実施された実験について責任を持つ。

データ解析担当者：必要なデータクリーニングを行い，データベースを固定し，データ解析を行う。中間報告会では，解析結果をまとめて報告する。

2.2 LLNA-DA の操作方法

資料 4「LLNA-DA 法プロトコール」と第 1 実験実施時に作成された資料 5「LLNA-DA 法実験 SOP (Version 2.0)」にもとづいて，この研究用に LLNA-DA バリ実行委が SOP を作成した。この SOP の最終版を資料 7「LLNA-DA 法実験 SOP (Version 3.0)」に示す。第 1 実験の SOP が 2 物質用であったのに対して，この版では 1 物質用，2 物質用の 2 つが作成された。第 1 実験で用いられた SOP との違いは，物質数の違いによる動物数等の変更（1 物質用の場合），群番号のつけ方，送付された被験物質や溶媒に何らかの指示がある場合にはそれに従う旨であり，手順や記載法に関しての大きな変更はなされていない。

LLNA-DA 法の実験手順の概略を以下に示す。

使用動物：雌の CBA/JNCrlj マウス（8 週齢にて入荷）

投与群設定：被験物質に合わせた溶媒を用いる溶媒対照、陽性対照(25% hexyl cinnamic aldehyde)，および 3 用量の被験物質

群あたり動物数：1 群あたり 4 匹

溶媒：事前に被験物質候補リスト（資料 3）に記載された溶媒を用いて，被験物質ごとに設定された濃度に調製後，遮蔽下で送付される。

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

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

懸濁させる。この懸濁液を攪拌し、膜組織を避けて 20 μ L サンプリングし、PBS 1.98mL 中に加える。これを 0.1mL 採取して 0.1mL の ATP 抽出試薬が入ったチューブに入れ約 20 秒間静止、発光試薬 0.1mL を添加後ルミノメータにより ATP 発光量を測定する。

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

1 回に実施する被験物質数：1 回の操作で 2 または 3 被験物質を実施する。

2.3 技術研修会

各実験施設の実験担当者が LLNA-DA 法の原理と操作法を理解できるように技術研修会を実施した。技術研修会では、研究計画書、SOP、記録用紙、データシートの説明と実験の操作方法の実施が行われた。各施設から 2 人または 3 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。

本研究すなわち第 2 実験では LLNA 法やそれに準じた方法の実験経験のない実験実施施設があるために、第 1 実験のときと比べ長めの時間をとった。被験物質の塗布の操作では、AOO だけでなく DMSO の塗布の実技が新たに加えられた。

さらに、確認用の映像資料も配布した。

2.4 ルミノメータの校正

各実験施設は、予備実験を実施する前に別添 2「ルミノメータ校正標準作業手順 Version 2.0」に従い、ATP 標準試薬を用いたルミノメータの校正を実施した。すべての施設で同じ種類の測定器による測定が行われた。その結果すべての施設で同様な測定結果が得られたことを実験開始前に確認した。

2.5 予備実験

作成された SOP で十分な実験が行えるかどうかを確認するために、資料 5「LLNA-DA 法標準作業手順 Version 2.0」にもとづき作成した、別添 10「LLNA-DA 法標準作業手順（予備試験用）Version 2.0」に従い陽性対照物質である hexylcinnamic aldehyde の 2 濃度を用いた予備実験を実施した。LLNA-DA 実行委は、予備実験の結果をもとに、SOP にしたがって実験を実施することができたか、陽性対照が陽性対照として機能しているか、用量反応関係が確認できるか、施設間差がどの程度あるかを検討した。その結果、すべての施設で陽性対照として使用する濃度で陽性と判断され、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間差が生じていなかった。1 施設で 2 用量間の値に大きな違いがみられなかった。この原因は特定できなかったが、

技術研修会で確認した実験操作をより注意深く実施することとされた。その他には大きな問題はなかったため、実験中に何か懸念事項が生じたら記録に残すこととし、本実験を実施することに決めた。SOP に関して大きな変更は行わなかった。

2.6 被験物質

第 1 実験と同様に被験物質を遮蔽下で実験を行うこととした。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、第 1 実験の開始前にすべての研究者に伝えられた。被験物質の候補は、既知データが豊富で、LLNA 法の実験結果が存在するものを採用することとされた。被験物質の候補リストを資料 3「被験物質の候補リスト」に示す。

実行委員長と実験施設に属さない被験物質選定担当者は、実施可能性を含めて 5 被験物質 (hexylcinnamic aldehyde, nickel sulfate, lactic acid, cobalt chloride, potassium dichromate) を選択した。選択基準は、第 1 実験で用いられた共通物質でもある陽性対照の hexylcinnamic aldehyde を含め、さらに第 1 実験で施設間差が生じていた cobalt chloride 及び nickel sulfate, なおかつ DMSO の溶媒を用いる他の 2 物質を選択するというものであった。選択された被験物質は、LLNA 法の結果を参考に 3 つの濃度が設定された。

cobalt chloride の適用濃度は、第 1 実験の計画時には 1%, 3%, 10% と設定されたが、第 1 実験ではじめにこの物質の実験を実施した施設で高濃度群での死亡が確認されたため、残りの 2 施設は 0.3%, 1%, 3% と再設定されている。本研究を実施する際、3% では薄すぎるという懸念が生じたことから、適用濃度は 1%, 3%, 5% に設定された。

これらの被験物質はあらかじめ被験物質ごとに設定された濃度に調製された後に遮蔽化され、対応する溶媒とともに各実験施設に送付された。

2.7 割付

使用する動物数を少なくするため、1 回の実験では、溶媒が同じ 2 つの被験物質群 (1 施設の 1 実験のみ 3 被験物質群) と共通の 1 つの溶媒の群を構成することにした。

被験物質割付担当者は、被験物質選定担当者が選択した被験候補物質のうち hexylcinnamic aldehyde を標準被験物質とし全実験施設に、その他 4 被験物質については、物質の感作性の程度を考慮して 4 施設に割り付けた。

2.8 試料等の配布

試料等手配担当者は、各被験物質の試料溶液を調製し、実験参加施設に配布した。必要に応じて保存方法に関する注意を示した。第 1 実験では被験物質と溶媒はプラスチックの容器に入れて送付したが、物質が容器を溶かす可能性が懸念されたために、本研究ではガラス瓶に入れられて送付した。

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

2.9 実験実施のスケジュール

技術研修会は 2006 年 10 月 3 日～5 日に国立医薬品食品衛生研究所（用賀）で実施した。

予備実験は 2006 年 10 月 2 日～11 月 8 日の間に実施した。

本実験は 2006 年 12 月 4 日～2007 年 2 月 7 日の間に実施した。

別添 11「実験実施期間プラン」に動物入荷と実験実施のスケジュールを示す。

2.10 データの管理

記録用紙

各実験施設は実験の記録・結果を SOP にもとづき作成された所定の記録用紙（別添 5「LLNA-DA バリデーション研究記録用紙」）に記録した。作成した記録用紙は、

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

の項目からなる。

データシート

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

データクリーニング

データ解析担当者は、収集したデータシートに必要となるデータが入力されているかどうかを確認した。また、ATP 発光量が実験時の記録と同じであるかどうかを確認した。

2.11 データベース

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

2.12 データ解析の方法

2.12.1 体重, リンパ節重量, ATP 発光量

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

2.12.2 一定の基準を満たす施設の選定方法

提案施設での陽性対照物質である 25% hexylcinnamic aldehyde の背景データを用いて個々の実験のばらつきに関する検出限界を作成した。本研究における陽性対照物質の個々の実験のばらつきが事前に定めた検出限界内である場合には, 一定の基準を満たす施設であるとした。

提案施設は第 1 実験の実験参加施設でもあったため, 検出限界を計算するための背景データは, 提案施設における予備実験の結果の値と 3 回実施された実験の陽性対照物質の結果の値および被験物質として実験された結果の値を用いた。検出限界の解析には, 各個体より得られる被験物質の ATP 発光量をその実験に対応した溶媒の ATP 発光量の平均値で除した値を用いた。ここでは, この値を ATP 発光量比と呼ぶことにする。ATP 発光量比の平均値は SI 値に相当する。SOP では, 1 回の実験で被験物質ごとに 4 個体を用いているので, ATP 発光量比は実験ごとに 4 回の繰り返しがあることになる。

検出限界の設定には, 品質管理における範囲の管理図の考え方に従い設定した。この方法では, 限界線は, 個々の実験の ATP 発光量比の範囲について, 範囲の分布の平均値に, 範囲の分布の標準偏差の定数倍を加えたものとして定義される (三浦ら (1968))。通常管理図では標準偏差に乗ずる定数としては 3 が用いられるが, ここではこの値を 2 とすることにした。この検出限界は, 以下の式を用いて計算することができる。

$$(\text{検出限界}) = 1.85 \times (\text{ATP 発光量比の範囲の平均値})$$

個々の実験における ATP 発光量比の範囲は, 実験内のばらつきを表す指標と

なるので、検出限界はこの範囲のばらつきとしておよそ標準偏差の 2 倍程度のばらつきは認めるということになる。

実験実施施設が一定の基準を満たすことの判定基準は、実験実施施設が被験物質として実施した 25% hexylcinnamic aldehyde での ATP 発光量比の範囲とその実験の陽性対照物質として得られた 25% hexylcinnamic aldehyde の ATP 発光量比の範囲のいずれかもしくはいずれもが、設定した基準線よりも大きくなることを条件とした。つまり、2 回の実験のいずれの範囲も検出限界を超えた場合、その実験実施施設は一定の基準を満たしていないということになる。

なお、参照までに、この判定に用いない実験の陽性対照の ATP 発光量比の範囲も結果に示すことにした。

2.12.3 実施のしやすさの検討

2.12.2 で設定した基準で、7 施設中 6 施設以上が基準を満たした場合には、LLNA-DA 法は実施しやすい方法であると判定することとし、そうでない場合に実施しやすいとはいえない方法であると判定することにした。

兵頭 (2007) は、実施のしやすさを表すために、定量的な指標を提案した。ここでは、これを兵頭の r と呼ぶことにする。この指標は、提案施設の背景データとしての ATP 発光量比と実験実施施設から得られた ATP 発光量比の全体の分散を、提案施設を除いた実験実施施設間の分散、実験施設内の分散、個々の実験内の分散に分解したときの、提案施設を除いた実験実施施設間の分散と全体の分散の比で定義される。

この指標の値が大きいことは、実験実施施設の施設間差が、他のばらつきの要因に比べて相対的に大きいことを示している。つまり、兵頭の r はその値が小さいほど、データのばらつきという観点から実施がしやすい試験法であるということを示している。

兵頭の r の計算は、提案施設および各実験実施施設から得られた 25% hexylcinnamic aldehyde での ATP 発光量比の値を用いた。指標の値の精度を確保するために、実験で 25% hexylcinnamic aldehyde のデータを用いることとした。提案施設については、予備実験の結果の値と 3 回実施された実験の陽性対照物質の結果の値および被験物質として実験された結果の値を用いた。各実験実施施設については、予備実験と被験物質として実験された結果の値および被験物質の陽性対照として実験された値を用いた。

2.12.4 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 ATP 発光量と溶媒群の ATP 発光量の比で算出される SI 値に基づき実施した。SI 値は、個々の実験の

各用量ごとにひとつの値が得られる。SI 値の近似的な 95%信頼区間は、別添 7 「SI 値とその 95%信頼区間の計算法」に示す方法により得ることができる。

2.12.5 施設内再現性、施設間再現性を評価する方法

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

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

2.12.6 ソフトウェア

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

3 結果

3.1 研究の質について

研究の質を確保するために、以下のことを実施した。

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

別添 11 に示す実験プランのプラン中 No.2 は「実験入荷の週」に記載した日に対応する「投与開始」、「試験終了」の日が誤りであることが実験期間中に判明した。このため、No.2 の期間に実験を実施した施設は「実験入荷の週」に入荷した動物を用いて実験を行った。投与開始は 12 月 24 日、試験終了は 12 月 31 日であり、SOP に記載された馴化期間、操作の日程は守られている。

3.2 選択された被験物質と割付け結果

割付は、割付計画にもとづいて行われた。表 3.2.1 に各施設への被験物質の割付結果を示す。基本的には 1 施設あたり 3 被験物質を実施したが、すべての被験物質を 4 施設以上の施設で実験するようにしたため、施設 11 は 5 被験物質物質分の実験を行った。

被験物質は、表 3.2.1 に示す割付記号が付され、各実験実施施設に送付された。

表 3.2.1 被験物質の割付

割付 記号	被験物質	感作性(LLNA 法)		溶媒	施設						
					11	12	13	14	15	16	17
G	B hexylcinnamic aldehyde	moderate	弱	AOO	○	○	○	○	○	○	○
A	J nickel sulfate	negative	無	DMSO	○	○		○		○	
B	M lactic acid	negative	無	DMSO	○		○		○	○	
D	E cobalt chloride	strong	強	DMSO	○		○	○			○
E	N potassium dichromate	strong	強	DMSO	○	○			○		○

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

表 3.2.2 被験物質の調製日と送付時の物質の状態および被験物質の投与日

施設	物質	調製日	送付時の物質の状態	投与日
11	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/12/20	溶解	2006/12/24
	E: cobalt chloride	2007/1/25	溶解	2007/1/30
	J: nickel sulfate	2007/1/25	高濃度で懸濁	2007/1/30
	M: lactic acid	2007/1/11	溶解	2007/1/17
	N: potassium dichromate	2007/1/11	溶解	2007/1/17
12	B: hexylcinnamic aldehyde	2007/1/11	溶解	2007/1/16
	J: nickel sulfate	2007/1/25	高濃度で懸濁	2007/1/30
	N: potassium dichromate	2007/1/25	溶解	2007/1/30
13	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/12/7	溶解	2006/12/13
	E: cobalt chloride	2007/1/17	溶解	2007/1/24
	M: lactic acid	2007/1/17	溶解	2007/1/24
14	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/12/7	溶解	2006/12/12
	E: cobalt chloride	2007/1/11	溶解	2007/1/16
	J: nickel sulfate	2007/1/11	高濃度で懸濁	2007/1/16
15	B: hexylcinnamic aldehyde	2007/1/11	溶解	2007/1/16
	M: lactic acid	2007/1/17	溶解	2007/1/23
	N: potassium dichromate	2007/1/17	溶解	2007/1/23
16	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/12/7	溶解	2006/12/13
	J: nickel sulfate	2007/1/11	高濃度で懸濁	2007/1/17
	M: lactic acid	2007/1/11	溶解	2007/1/17
17	B: hexylcinnamic aldehyde	2006/12/7	溶解	2006/12/13
	E: cobalt chloride	2007/1/17	溶解	2007/1/24
	N: potassium dichromate	2007/1/17	溶解	2007/1/24

3.3 データの取り扱いについて

析出、沈殿等について

表 3.3.1 に送付された被験物質の状態と対処事項をまとめた。

表 3.3.1 被験物質の状態と取り扱い

割付記号	物質コードと物質名	施設番号	状態	対処事項
C	B hexylcinnamic aldehyde	11	-	
		12	-	
		13	-	
		14	-	
		15	-	
		16	-	
		17	-	
A	J nickel sulfate	12	固化	超音波処理、懸濁確認後適用
		14	沈殿あり	超音波処理、懸濁確認後適用
		16	沈殿あり	超音波処理、懸濁確認後適用
		11	不溶解	超音波処理、懸濁確認後適用
B	M lactic acid	11	-	
		13	-	
		16	-	
		15	-	
		14	-	
D	E cobalt chloride	13	-	
		17	-	
		11	-	
		12	固化	溶解確認後適用
E	N potassium dichromate	15	凝固	溶解確認後適用
		17	-	
		11	-	
		12	-	

データクリーニングの結果

実験担当者は、実験中に測定した ATP 発光量などを、データシートをプリントアウトしたものに書き込み、後に電子ファイルのデータシートに入力した。データ解析担当者は、測定値を記入したプリントアウトを集め、入力された電子ファイルのデータシートの値との整合性の確認が行い、最終的な値を決めた。

3.4 背景基礎データ

3.4.1 体重

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

施設によっては1日目に比べ8日目の方が, 体重の増加傾向がみられるが, 施設間の大きな変動はみられなかった。

表 3.4.1 実験開始1日目の動物の体重 (g) の基本統計量

施設	データ数	平均値	標準偏差	最小値	25%点	中央値	75%点	最大値
11	96	22.9	1.3	19.9	22.1	22.9	23.6	26.5
12	60	21.6	1.0	18.8	21.0	21.7	22.2	24.1
13	60	22.2	1.1	19.5	21.4	22.1	23.1	24.8
14	60	21.8	1.5	18.7	20.8	21.8	23.2	24.3
15	60	22.5	1.1	20.0	21.8	22.5	23.2	25.2
16	60	22.3	1.5	18.8	21.4	22.6	23.4	25.5
17	60	22.1	1.4	19.5	20.9	22.3	23.1	26.4

表 3.4.2 実験開始8日目の動物の体重 (g) の基本統計量

施設	データ数	平均値	標準偏差	最小値	25%点	中央値	75%点	最大値
11	96	23.4	1.3	21.1	22.5	23.3	24.2	27.1
12	60	23.1	1.2	20.4	22.4	23.2	23.7	26.5
13	60	22.9	1.3	20.2	22.0	22.7	23.8	26.2
14	59	22.3	1.9	16.3	20.9	22.4	23.7	25.9
15	60	23.8	1.3	21.3	22.7	23.6	25.0	26.6
16	60	23.3	1.6	19.1	22.5	23.4	24.5	27.0
17	60	23.1	1.4	19.7	22.1	23.3	24.0	26.7

3.4.2 ATP 発光量

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

全 7 施設が実施した被験物質 B (hexylcinnamic aldehyde), 4 施設が実施した被験物質 E (cobalt chloride) と N (potassium dichromate) ではすべての施設で用量の増加とともに ATP 発光量が増加した。

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

		施設															
		11				12				13				14			
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	
B: hexylcinnamic aldehyde	AOO	4	21328	8537	4	27436	7629	4	24739	6350	4	24348	8236				
	5%	4	32306	7470	4	45178	8970	4	35059	13111	4	50408	15075				
	10%	4	70689	7059	4	94494	20913	4	110638	34223	4	88935	49202				
	25%	4	95348	32502	4	156615	19035	4	133833	22340	4	185142	43204				

		施設														
		15				16				17						
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
B: hexylcinnamic aldehyde	AOO	4	31189	10511	4	28421	8943	4	23888	10275						
	5%	4	46853	7275	4	65209	12332	4	31668	6045						
	10%	4	78471	11510	4	146720	30935	4	110331	13800						
	25%	4	122146	25678	4	239220	35785	4	154106	28583						

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

		施設															
		11				13				14				17			
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	
E: cobalt chloride	DMSO	4	82093	26298	4	81326	13350	4	41770	12971	4	50815	5671				
	1%	4	122193	21742	4	133890	34318	4	97101	15349	4	148776	68574				
	3%	4	141919	33024	4	199335	5756	4	171272	19452	4	216116	18966				
	5%	4	165350	10204	4	206394	16349	4	177705	46577	4	256978	54531				

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

		施設															
		11				12				14				16			
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	
J: nickel sulfate	DMSO	4	82093	26298	4	83046	6308	4	41770	12971	4	76153	28228				
	1%	4	53652	8085	4	82896	14003	4	77804	25666	4	90029	11264				
	3%	4	65034	25414	4	103345	24614	4	65200	11620	4	118932	13811				
	10%	4	60451	17784	4	80596	21515	3	88990	14982	4	88482	19237				

表 3.4.3.d ATP 発光量 (被験物質 M : lactic acid)

		施設											
		11			13			15			16		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
M: lactic acid	DMSO	4	65060	9211	4	81326	13350	4	49353	21291	4	76153	28228
	5%	4	60576	20296	4	80639	18883	4	45730	8622	4	69247	15579
	10%	4	49033	11761	4	55369	7627	4	47928	15171	4	60621	11273
	25%	4	52131	16088	4	60124	13945	4	35259	2939	4	69108	14746

表 3.4.3.e ATP 発光量 (被験物質 N : potassium dichromate)

		施設											
		11			12			15			17		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
N: potassium dichromate	DMSO	4	65060	9211	4	83046	6308	4	49353	21291	4	50815	5671
	0.1%	4	123936	17967	4	157464	29682	4	131244	35222	4	165248	46056
	0.3%	4	145833	41893	4	217061	37807	4	191819	51627	4	257138	29816
	1.0%	4	311009	24188	4	338610	33485	4	296431	75377	4	323834	60878

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

		施設											
		11			12			13			14		
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
PC (hexylcinnamic aldehyde)	AOO	12	25807	8795	8	30147	6951	8	24943	6509	8	27245	7022
	25%	12	102118	22127	8	142679	50388	8	136950	22057	8	184010	31146

		施設											
		15			16			17					
被験物質	濃度	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差			
PC (hexylcinnamic aldehyde)	AOO	8	33713	7937	8	37383	5294	8	17417	7195			
	25%	8	143322	31990	8	268199	47663	8	138799	25305			

3.4.3 リンパ節重量とATP発光量の関係

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

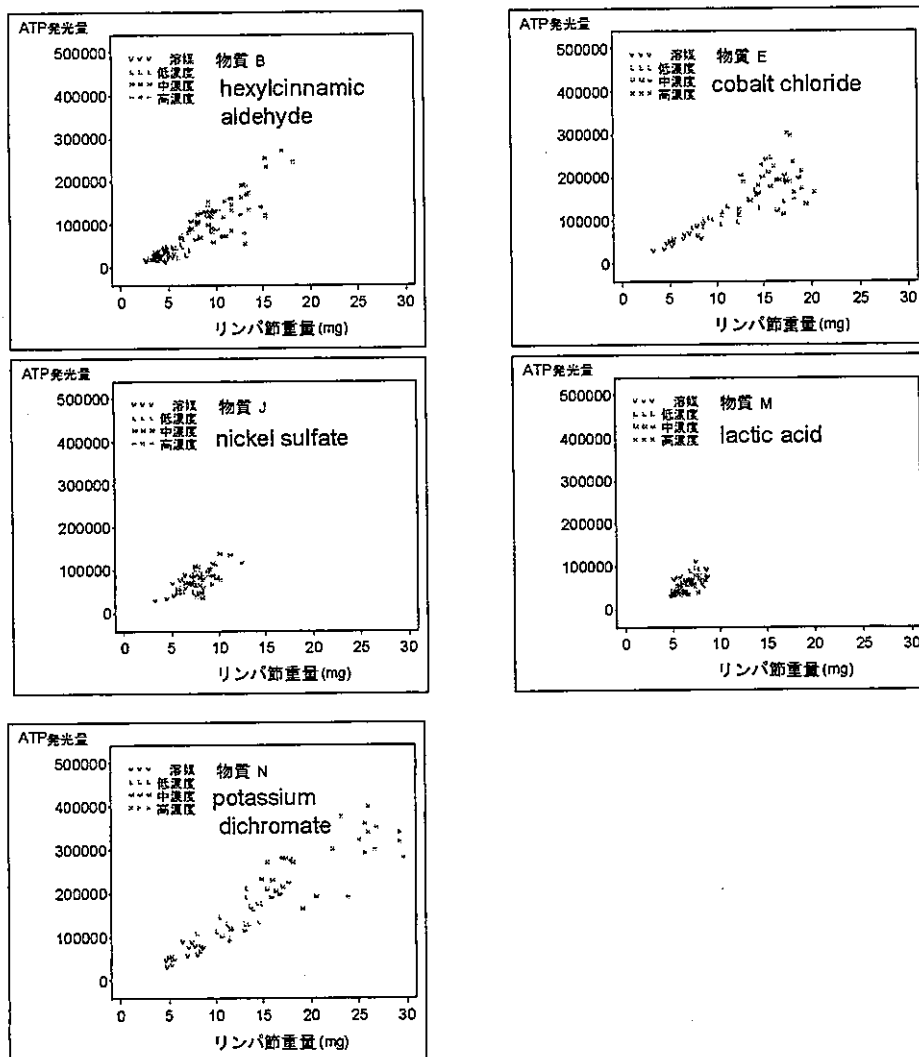


図 3.4.1 リンパ節重量とATP発光量の関係

3.5 LLNA-DA の分析感度

本報告書では、分析感度を陽性対照物質が適切に陽性と判定される能力と定義する。図 3.5.1, 図 3.5.2 にそれぞれ予備実験, 本実験における各実験の陽性対照物質の SI 値とその 95%信頼区間を示す。予備実験では、2つの濃度の実験が実施された。図 3.5.1 の L は 10% hexylcinnamic aldehyde, H が 25% hexylcinnamic aldehyde であり、本実験の陽性対照は図中の H に相当する。

これらの図より陽性対照 (25% hexylcinnamic aldehyde) ではいずれの施設でも陽性と判定する基準値である SI 値 3 を超えていることがわかる。従ってこの試験法は十分な分析感度を持つといえるであろう。

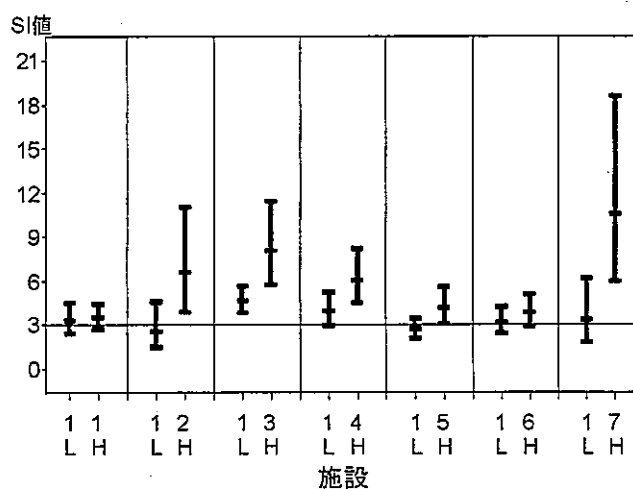


図 3.5.1 予備実験における陽性対照の SI 値とその 95%信頼区間

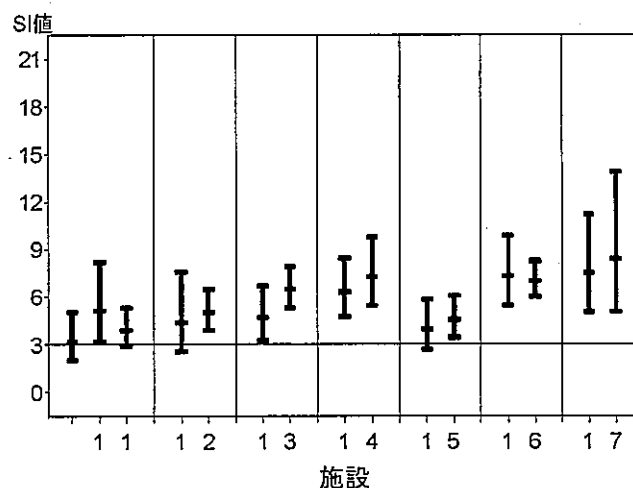


図 3.5.2 本実験における陽性対照の SI 値とその 95%信頼区間

3.6 各被験物質の用量反応関係

表 3.6.1 に施設ごとの SI 値の値を、図 3.6.1 に SI 値の用量反応関係を示す。図中 con と示されているのは、SI 値の重み付き平均を示している。

被験物質 B (hexylcinnamic aldehyde), E (cobalt chloride), N (potassium dichromate) では各施設で明確な用量反応関係がみられる。B (hexylcinnamic aldehyde) と N (potassium dichromate) では高濃度での SI 値は実験を行ったすべての施設で 3 を超えている。被験物質 J (nickel sulfate), M (lactic acid) は実施された濃度の範囲では SI 値の値は小さく、用量反応関係は明確ではなく、陰性物質であることが示唆される。

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

被験物質	濃度	施設						
		11	12	13	14	15	16	17
B: hexylcinnamic aldehyde	5%	1.51	1.65	1.42	2.07	1.5	2.29	1.33
	10%	3.31	3.44	4.47	3.65	2.52	5.16	4.62
	25%	4.47	5.71	5.41	7.60	3.92	8.42	6.45

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

被験物質	濃度	施設			
		11	13	14	17
E: cobalt chloride	1%	1.49	1.65	2.32	2.93
	3%	1.73	2.45	4.10	4.25
	5%	2.01	2.54	4.25	5.06

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

被験物質	濃度	施設			
		11	12	14	16
J: nickel sulfate	1%	0.65	1.00	1.86	1.18
	3%	0.79	1.24	1.56	1.56
	10%	0.74	0.97	2.13	1.16

表 3.6.1.d 各施設の SI 値 (被験物質 M : lactic acid)

被験物質	濃度	施設			
		11	13	15	16
M: lactic acid	5%	0.93	0.99	0.93	0.91
	10%	0.75	0.68	0.97	0.80
	25%	0.80	0.74	0.71	0.91

表 3.6.1.e 各施設の SI 値 (被験物質 N : potassium dichromate)

被験物質	濃度	施設			
		11	12	15	17
N: potassium dichromate	0.1%	1.90	1.90	2.66	3.25
	0.3%	2.24	2.61	3.89	5.06
	1.0%	4.78	4.08	6.01	6.37

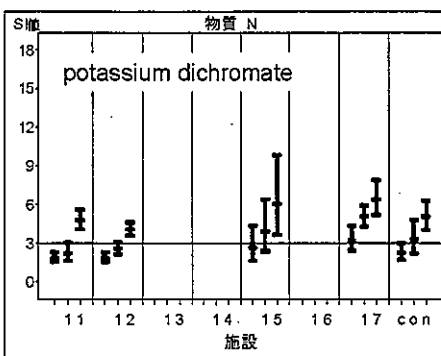
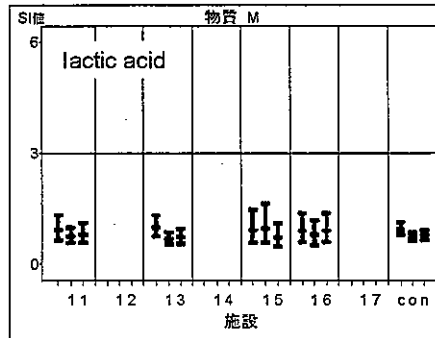
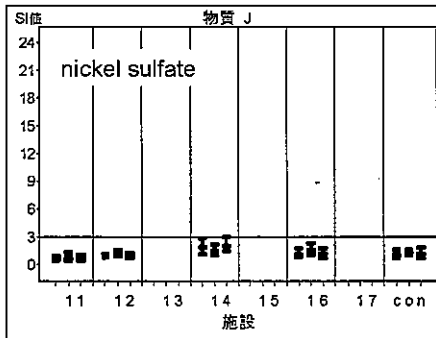
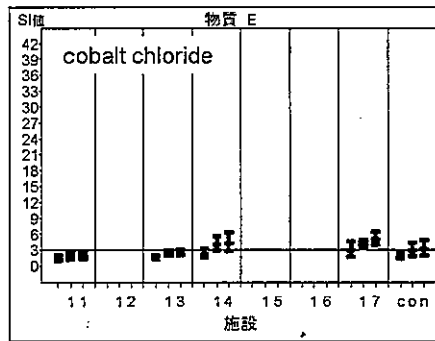
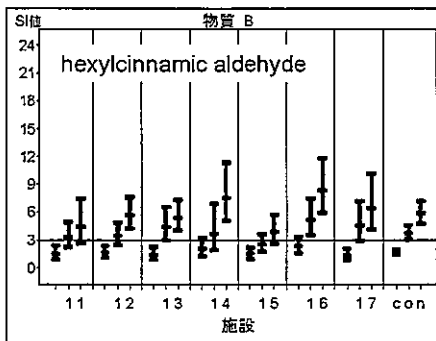


図 3.6.1 SI 値の用量反応関係

3.7 施設間の再現性

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

$\exp(\tau^2)$ の値がいくらであれば施設間差が大きいと判断するというような基準値は特にはないが、以前の研究（第1実験）の結果からは1.2より小さい場合にはばらつきは小さく、施設間差は大きくはないといえるであろうと考察した。ここではの結果は、全5物質でのすべての濃度で1.2より小さな値となった。つまり、きわめて小さな施設間変動であったといえるであろう。

表 3.7.1 各被験物質のばらつきの指標施設間分散の値

被験物質	低濃度			中濃度			高濃度		
	SI値	95%信頼区間	$\exp(\tau^2)$	SI値	95%信頼区間	$\exp(\tau^2)$	SI値	95%信頼区間	$\exp(\tau^2)$
B: hexylcinnamic aldehyde	1.68	(1.44 , 1.95)	1.00	3.77	(3.08 , 4.60)	1.03	5.87	(4.82 , 7.15)	1.03
E: cobalt chloride	1.97	(1.48 , 2.62)	1.05	2.97	(1.98 , 4.48)	1.17	3.23	(2.11 , 4.93)	1.18
J: nickel sulfate	1.07	(0.72 , 1.61)	1.15	1.29	(1.02 , 1.64)	1.03	1.16	(0.75 , 1.80)	1.18
M: lactic acid	0.95	(0.79 , 1.14)	1.00	0.74	(0.64 , 0.85)	1.00	0.78	(0.65 , 0.93)	1.00
N: potassium dichromate	2.29	(1.75 , 3.01)	1.06	3.28	(2.23 , 4.81)	1.14	5.05	(4.06 , 6.27)	1.04

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

施設によって異なる判定がされたのは、被験物質E（cobalt chloride）のみであった。

表 3.7.2 各施設での個々の物質の判定結果

被験物質	感作性*		施設							溶媒	
			11	12	13	14	15	16	17		
B: hexylcinnamic aldehyde	+	Moderate	+	+	+	+	+	+	+	+	AOO
E: cobalt chloride	+	Strong	-		-	+				+	DMSO
J: nickel sulfate	-	Negative	-	-		-			-		DMSO
M: lactic acid	-	Negative	-		-			-	-		DMSO
N: potassium dichromate	+	Strong	+	+				+		+	DMSO

*:LLNA法の評価結果に基づく感作性の判定

3.8 施設内の再現性

各施設の各実験から得られた陽性対照の SI 値 (図 3.5.2) について, 施設ごとに重み付き平均による SI 値とその 95%信頼区間および $\exp(\tau^2)$ を計算した結果を表 3.8.1 に示す. この計算には予備実験の陽性対照は含めていない.

図 3.5.2 からわかるように陽性対照物質の $\exp(\tau^2)$ はすべての施設で最小値である 1 に近い値であった.

表 3.8.1 陽性対照による施設内再現性

施設	SI値	95%信頼区間	$\exp(\tau^2)$
11	3.94	(3.16 , 4.92)	1.00
12	4.89	(3.86 , 6.19)	1.00
13	5.71	(4.17 , 7.81)	1.03
14	6.78	(5.52 , 8.33)	1.00
15	4.34	(3.44 , 5.47)	1.00
16	7.10	(6.16 , 8.19)	1.00
17	7.83	(5.72 , 10.73)	1.00

3.9 一定の基準を満たす施設の選定と実施のしやすさ

3.9.1 提案施設の背景データ

提案施設よる 5 回の実験による得られた 25% hexylcinnamic aldehyde の ATP 発光量比とその範囲を表 3.9.1 に示す。

この表の下段に記載したように ATP 発光量比の範囲の平均値は 2.65 となった。この値にもとづき計算した検出限界の値は 4.91 となった。

表 3.9.1 提案施設の 25% hexylcinnamic aldehyde の ATP 発光量比と範囲

実験番号	ATP発光量比	範囲
1	5.26	2.30
	6.49	
	4.18	
	4.92	
2	6.49	2.15
	4.71	
	4.76	
	6.86	
3	8.09	3.14
	8.33	
	6.58	
	5.20	
4	7.10	2.76
	4.34	
	5.61	
	6.73	
5	7.09	2.89
	5.70	
	4.20	
	6.15	
平均値		2.65
検出限界		4.91

3.9.2 実験実施施設が一定の基準を満たすかどうかの判定

各実験実施施設の各実験における 25% hexylcinnamic aldehyde の ATP 発光量比の範囲を表 3.9.2 に示す。この表の実験番号 2 は被験物質としての実験結果、実験番号 1 は、実験番号 2 の実験時の陽性対照として得られた実験結果である。実験番号 3 と 4 は 25% hexylcinnamic aldehyde 以外の物質の実験時の陽性対照として得られた実験結果である。

どの施設においても実験番号 1 と 2 の ATP 発光量比の範囲の値は検出限界の値 4.91 を超えていないので、7 施設すべてが一定の基準を満たしているという結果となった。

表 3.9.2 各実験実施施設の 25% hexylcinnamic aldehyde の ATP 発光量比の範囲

施設	実験番号	ATP発光量比の範囲
11	1	1.89
	2	3.29
	3	1.51
	4	2.19
12	1	4.55
	2	1.50
	3	2.27
13	1	2.45
	2	1.94
	3	1.00
14	1	1.34
	2	3.86
	3	4.02
15	1	2.49
	2	1.83
	3	1.67
16	1	4.38
	2	2.94
	3	0.67
17	1	3.47
	2	2.86
	3	1.86

3.9.3 実施しやすさの検討結果

表 3.9.3 に、25% hexylcinnamic aldehyde の ATP 発光量比における、提案施設を含めない実験実施施設の施設間分散、実験実施施設の実験間分散、実験内分散の分散、およびそれらから計算される兵頭の r の値を示す。兵頭の r の値は 0.4 であり、施設間差は、実験内のばらつきに比べてそれほど大きくはなっていない。よって、LLNA-DA 法が実施しやすい方法であるといえるであろう。

表 3.9.3 兵頭の r

施設間分散 (提案施設を除く)	実験間分散	実験内分散	兵頭の r
1.76	0.97	1.62	0.4

4 考察

4.1 本研究の位置づけと意義

本研究の位置付け

第2実験では、第1実験で明確にはできなかった2つの点に関して検討を行った。1つは一定の基準をみたす施設の判定法の構築と構築された基準に基づき一定とみなされた施設での施設間再現性の評価であり、2つめは LLNA-DA 法の金属アレルギーへの適用の可能性、DMSO を溶媒とする被験物質へのさらなる情報の収集である。

第1点目については、提案施設の 25% hexylcinnamic aldehyde の背景データを利用して、実験内における測定値のばらつきの範囲を構成し、個々の施設での同じ物質のデータが、この範囲の中に入れば一定の基準を満たすことにした。この方法を適用した結果、第2実験で実験を実施した全7施設が基準を満たすことになった。この点については、SOP の記載が実験者にとって適切に実験を行うのに十分であったという以外に、技術研修を適切に実施したことや予備実験によりデータを確認したことが大きいと考えられる。

第2点目については、第1実験で施設間差の大きかった2つの金属塩(被験物質 E (cobalt chloride) と J(nickel sulfate)) と第2実験で追加された金属塩である被験物質 N (potassium dichromate) の SI 値はいずれも施設間のばらつきは小さく、LLNA-DA 法は金属塩についても適用が可能であることを示したといえる。さらに、上記3物質と被験物質 M (lactic acid) はいずれも溶媒として DMSO が使用され、これら4物質のすべてで施設間再現性は高かったために、投与時に注意すれば DMSO を溶媒として利用できることを示した。

本研究の特徴的な点

バリデーション研究では、transferability はひとつの基準となっているものの、transferability を定量的な評価するための具体的な方法論は十分に用意されてこなかった。この第2実験では、その方法論の構築を行うとともに具体的に適用した。

第2実験のもうひとつの特徴は、第1実験とは異なる7施設が実験を実施したことである。第1実験で用いられた共通物質のひとつであり陽性対照物質でもある hexylcinnamic aldehyde を第2実験でも共通物質とすることで、この物質を通して、第1実験と第2実験の乖離について知ることができるように設定した。このことにより hexylcinnamic aldehyde に関して、全17実験実施施設からの実験データが得られている。

また、溶媒が DMSO である 4 物質を用いて実験を行ったため、第 1 実験では不十分であった DMSO の ATP 発光量やリンパ節重量のデータが収集できた。

4.2 本研究で評価した LLNA-DA 法の操作上の特徴

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

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

4.3 本研究の妥当性

4.3.1 被験物質の選択

第 2 実験では、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 の被験物質リスト（資料 3）の中から 5 被験物質を選択した。

選択の基準は、第 1 実験で共通物質であり陽性対照物質である被験物質 B (hexylcinnamic aldehyde) を選択すること、被験物質 E (cobalt chloride) と J (nickel sulfate) と DMSO を溶媒とする他の 2 物質を選ぶこととされた。なお、遮蔽している物質が明らかになる可能性を大きくしないために、この基準は実験実施者には知らせなかった。

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、5 被験物質の感作性の内訳は、無が 2 物質、弱が 1 物質、強が 2 物質である。

4.3.2 データの質に関して

実施可能性の面から、第2実験は第1実験と同様に、完全な good laboratory practice (GLP) に対応した実験を求めることまではできていない。しかし、データの質を担保するために以下に記載する配慮を行った。

実験についての記録用紙（別添5）を作成した。記録用紙には実験担当者・実験責任者のもとで、機器の校正・作動確認、使用液・試薬の使用について、動物への適用、実験時間が記録され、各施設に残されている。

実験を実施する前に、すべての施設で使用する ATP 発光量の測定機器の校正が実施され、問題がないことを確認した。

測定値がこの研究のために準備された一定の書式のデータシートに正しく記録されているかどうかを確認するために、実験中にデータシートのプリントアウトに記録された ATP 発光量の値と入力されたファイルでの値の整合性の確認を行った。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。

4.3.3 施設内再現性

限定された結果であるが、陽性対照物質である 25% hexylcinnamic aldehyde AOO 溶液に関しては各施設で2ないし3回の繰り返しがあつた。すべての施設のすべての実験結果で陽性対照群での SI 値は基準値である 3 を超えていた（図 3.5.2）。

第2実験で用いたばらつき指標 $\exp(\tau^2)$ で実験間の再現性を評価した場合、その値は施設によって 1.00 から 1.03 の範囲であつた（表 3.8.1）。この結果は第1実験の結果とほぼ同等であつた。

これらの結果から、陽性対照物質での施設内再現性は高いといえる。

4.3.4 施設間再現性

5 物質中 7 施設で実験を行つた物質 B (hexylcinnamic aldehyde) は、用量反応関係、SI 値に基づく感作性の判定、各濃度の SI 値に関して高い施設間再現性を示した。

4 施設で実験を行つた残り 4 物質のうち、被験物質 J (nickel sulfate), N (potassium dichromate), M (lactic acid) では、用量反応関係、SI 値に基づく感作性の判定、各濃度の SI 値に関して高い施設間再現性を示した。

被験物質 E (cobalt chloride) は、SI 値に基づく感作性の判定では施設間差が生じたが、用量反応関係に関しては高い施設間再現性であつた。この物質の高濃度での SI 値は判定の基準値である 3 前後であり、実験による変動が影響したと考えられる。本研究では濃度は固定されているので高濃度以上での実験は

実施されていないが、現実にある特定の物質を評価する場合には用量反応がみられ高濃度でSI値が3よりもわずかに小さな値であれば、さらに高い濃度での実験が実施されるであろう。

4.3.5 LLNA-DA 法の実施のしやすさ

第2実験では、施設が一定の基準をみたすかどうかの検討、そして、試験法が実施のしやすい試験法であるのかの検討を行った。この結果、全7実験実施施設が一定の基準を満たした。また、LLNA-DA法は実施のしやすい試験法であるということが定量的に示された。この結果は、おそらく技術移転の実施によるところが大きいと考えられる。技術移転の実施により、文書化されたSOPを読むだけでは理解できない実験の詳細な点を把握するだけでなく、施設間で異なっていた細かい実験技術を共有化することができたと考えられる。技術研修を行わなかった場合にどのような結果になるのかはこの研究からは知ることができない。よって、新たにLLNA-DA法を導入する場合、可能な限り提案施設等のLLNA-DA法の実験操作に関して豊富な経験をもつ施設から技術研修を受けるなどし、適切な実験方法の習得に努めることを推奨する。

4.3.6 個々の被験物質に対する考察

被験物質B (hexylcinnamic aldehyde) は、割付に考慮した分類に基づくと弱 (moderate) に分類される。結果は7施設のすべてで陽性と判定された。

被験物質E (cobalt chloride) は、割付に考慮した分類に基づくと強 (strong) に分類される。この物質は第1実験で報告された濃度よりも高い濃度での実験が行われたが、4施設中2施設は陰性と判定した。しかしながら、高用量 (5%) でのSI値はそれぞれ2.01, 2.54, 4.25, 5.06であり、ばらつきは小さく、いずれも施設も濃度の増加とともにSI値は増加した。

被験物質J (nickel sulfate) は、割付に考慮した分類に基づくと無 (negative) に分類されるが、この物質は感作性物質であり、LLNA法では検出できない物質として知られている。第1実験のときには大きかった施設間差は小さくなり、4施設ともに陰性と判定し、用量反応関係はみられなかった。

被験物質M (lactic acid) は、割付に考慮した分類に基づくと無 (negative) に分類される。4施設ともに陰性と判定し、用量反応関係はみられなかった。

被験物質N (potassium dichromate) は、割付に考慮した分類に基づくと強 (strong) に分類される。4施設ともに陽性と判定し、用量反応関係がみられた。高用量 (1%) でのSI値はそれぞれ4.78, 4.08, 6.01, 6.37であった。

4.4 第1実験から得られた結果を含めての考察

本研究では、3物質について第1実験と同じ物質を用いている。ここでは第1実験報告書で提示された結果とこの報告書で報告された結果を再度示し、2つの研究結果の考察を示す。

4.4.1 溶媒のATP発光量とリンパ節重量

第1実験と第2実験ともに、1回の実験で2もしくは3被験物質の適用した。このことにより、同じ実験内での溶媒は同じものとなっている。

第1実験と第2実験で用いられた溶媒は、AOO, ACE, DMSOの3種類である。全17施設から得られたAOO, ACE, DMSOのATP発光量の平均値と標準偏差をそれぞれ表4.4.1, 表4.4.2, 表4.4.3に、リンパ節重量の平均値と標準偏差をそれぞれ表4.4.4, 表4.4.5, 表4.4.6に示す。これらの表の下段は、同時に実験された被験物質のコードを示している。これらのデータは、今後LLNA-DA法を使用する施設にとって、背景データを考える上で有用な情報となるであろう。

表 4.4.1 被験物質別の AOO の ATP 発光量

施設														
1			2			3			4			5		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	27188	10027	4	26159	2157	4	35610	7212	4	42866	9956	4	11899	7366
A, C, H			A, K			A, H			A, F			A, F		
4	24583	5761	4	41189	17452	4	35652	12253	4	43007	8931	4	19146	6582
B, I			B, I			B, I			B, I			B, I		
12	23639	5906	12	30284	11576	4	24047	3932	12	44371	9224	12	15183	5554
PC			PC			C, L			PC			PC		
						12	25429	5894						
						PC								

施設														
6			7			8			9			10		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	13910	3921	4	22466	3515	4	20576	5546	4	26842	9515	4	53350	14893
A, K			A, H			A, G			A, F			A, L		
4	16375	3953	4	29925	6142	4	12207	4127	4	29602	8049	4	29077	2876
B, I			B, I			B, I			B, I			B, I		
12	10447	4413	4	21546	13493	12	18428	4502.7	8	26327	5483.5	8	22309	6393
PC			K, L			PC			PC			PC		
			12	25112	8035									
			PC											

施設														
11			12			13			14			15		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	21328	8537	4	27436	7629	4	24739	6350	4	24348	8236	4	31189	10511
B			B			B			B			B		
12	25807	8795	8	30147	6951	8	24943	6509	8	27245	7022	8	33713	7937
PC			PC			PC			PC			PC		

表 4.4.1 被験物質別の AOO の ATP 発光量 (つづき)

施設					
16			17		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	28421	8943	4	23888	10275
B			B		
8	37383	5294	8	17417	7195
PC			PC		

表 4.4.2 被験物質別の ACE の ATP 発光量

施設					
1		2		5	
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	17947	4929	4	38044	13217
D, G		D, G		D, G	

表 4.4.3 被験物質別の DMSO の ATP 発光量

施設					
4		6		8	
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	100396	24632	4	4184	2395
E, J		E, J		E, J	

施設														
11			12			13			14			15		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	82093	26296	4	83046	6308	4	81326	13350	4	41770	12971	4	49353	21291
E, J			J, N			E, M			E, J			M, N		
4	65060	9211												
M, N														

施設					
16			17		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	76153	28228	4	50815	5671
J, M			E, N		

表 4.4.4 被験物質別の AOO のリンパ節重量

施設														
1			2			3			4			5		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	4.3	0.7	4	3.3	0.3	4	4.6	0.6	4	4.8	0.4	4	2.9	0.9
A, C, H			A, K			A, H			A, F			A, F		
4	3.9	0.5	4	3.8	0.7	4	4.3	0.6	4	4.7	0.4	4	4.5	0.7
B, I			B, I			B, I			B, I			B, I		
12	3.8	0.4	12	3.8	0.8	4	4.0	0.4	12	5.0	0.6	12	3.8	1.1
PC			PC			C, L			PC			PC		
						12	4.4	0.5						
						PC								

施設														
6			7			8			9			10		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	4.4	0.4	4	3.4	0.6	4	3.3	0.6	4	5.0	0.4	4	7.4	1.0
A, K			A, H			A, C			A, F			A, L		
4	4	0.2	4	3.7	0.6	4	2.4	0.5	4	5.3	0.8	4	5.3	0.6
B, I			B, I			B, I			B, I			B, I		
12	3.6	0.5	4	3.8	1.0	12	3.5	0.5	8	4.9	0.5	8	5.0	2.1
PC			K, L			PC			PC			PC		
			12	3.9	1.1									
			PC											

施設														
11			12			13			14			15		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	5.1	0.5	4	4.4	0.3	4	3.6	0.3	4	3.4	0.5	4	4.1	1.0
B			B			B			B			B		
12	5.3	1.0	8	4.9	0.6	8	3.7	0.4	8	3.7	0.5	8	4.1	0.6
PC			PC			PC			PC			PC		

施設					
16			17		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	4.2	0.6	4	3.1	0.6
B			B		
8	4.2	0.5	8	2.6	0.8
PC			PC		

表 4.4.5 被験物質別の ACE のリンパ節重量

施設								
1			2			5		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	3.4	0.4	4	4.6	0.7	4	3.7	0.6
D, G			D, G			D, G		

表 4.4.6 被験物質別の DMSO のリンパ節重量

施設								
4			6			8		
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
4	6.8	1.1	4	3.5	0.2	4	3.8	0.6
E, J			E, J			E, J		

施設												
11			12			13			14		15	
n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差	
4	9.2	2.2	4	7.4	0.8	4	7.7	1.0	4	4.9	1.3	
E, J			J, N			E, M			E, J		M, N	
4	8.1	0.7										
M, N												

施設				
18		17		
n	平均値	標準偏差	n	平均値
4	5.9	1.1	4	5.1
J, M		E, N		

第 1 実験の報告書で考察したように、DMSO の ATP 発光量のばらつきは、第 1 実験における 3 施設（施設 4, 6, 8）間で約 4,000 から 100,000 の値をとり、乖離が大きい。DMSO は AOO や ACE に比べて塗布が困難であり、施設によっては十分に塗布が行えなかったことがこのようなばらつきの原因になったと考えられる。この反省に基づき、第 2 実験の技術研修では、DMSO の塗布操作が加えられた。第 2 実験での DMSO の ATP 発光量のばらつきは、約 49,000 から 85,000 程度であり、施設間のばらつきは小さいものとなった。溶媒に DMSO を用いる場合、他の溶媒に比べて塗布操作は注意すべきであろう。

また、AOO や ACE に比べて、DMSO の ATP 発光量、リンパ節重量は大きな値をとっている。このことから、溶媒である DMSO そのものがリンパ節増殖能を有していると考えられる。同様な傾向は、いくつかの LLNA の報告でもみられる（例えば Ryan ら (2002), Warbrick ら(1999), Wright ら (2001)）。溶媒群の ATP 発光量が大きな傾向になることは、SI 値を相対的に小さくするであろうから、用いる溶媒によって、SI 値の大きさが多少変化するであろうことが示唆される。特に溶媒として DMSO を用いた場合には、溶媒群における ATP 発光量が大きくなる傾向があることは意識しておくべきであろう。

4.4.2 物質 B : hexylcinnamic aldehyde

陽性対照物質でもある hexylcinnamic aldehyde は、第 1 実験、第 2 実験の共通物質でもあった。したがって、すべての実験実施施設がこの物質の実験を行ったことになる。

第 1 実験、第 2 実験の遮蔽下での hexylcinnamic aldehyde の用量反応関係を図 4.4.1 に示す。

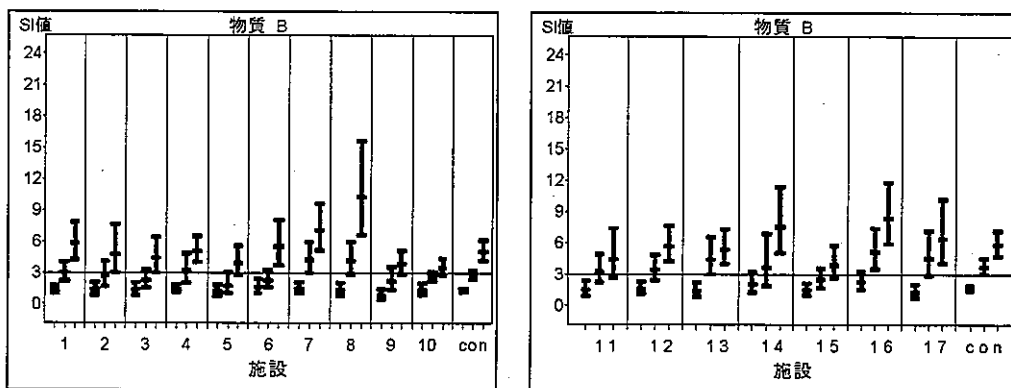


図 4.4.1 hexylcinnamic aldehyde の用量反応関係 (全 17 施設)

図 4.4.1 より、この物質について、第 1 実験と第 2 実験の間の差はないといえる。また、全 17 施設の施設間差もきわめて小さいことがわかる。

4.3.3 物質 E : cobalt chloride と物質 J : nickel sulfate

第 2 実験の目的のひとつは、第 1 実験のみでは結論を得ることが困難であった物質 E (cobalt chloride) と物質 J (nickel sulfate) の追加検討であった。

図 4.4.2 と図 4.4.3 に物質 E (cobalt chloride) と物質 J (nickel sulfate) の用量反応関係を示す。

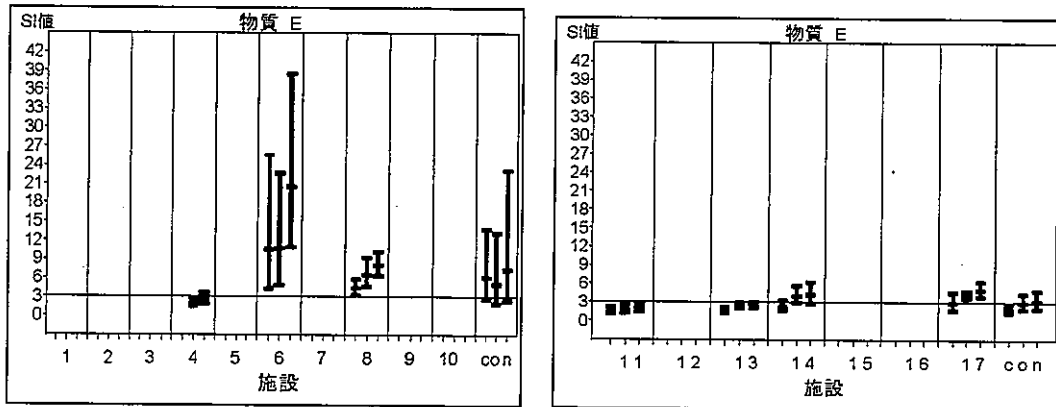


図 4.4.2 cobalt chloride の用量反応関係

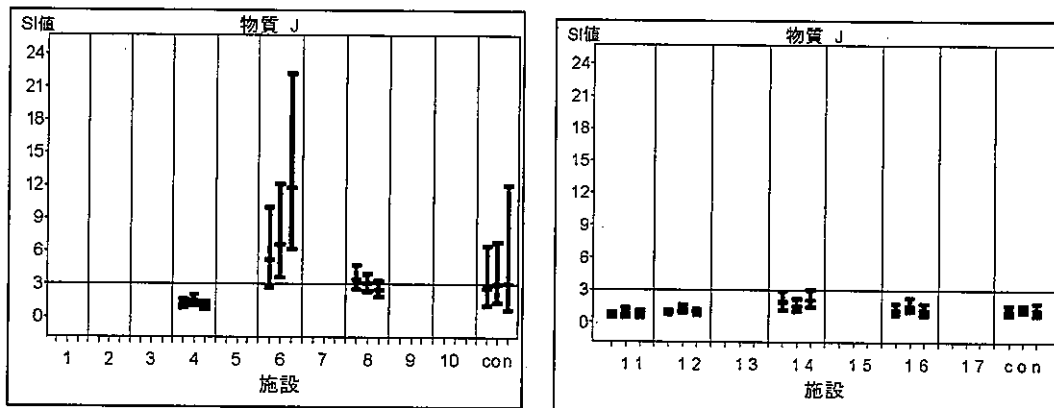


図 4.4.3 nickel sulfate の用量反応関係

これらの図から、明らかのように第 1 実験でみられた大きな施設間差は第 2 実験ではみられなかった。この 2 つ物質の溶媒は DMSO であり、4.4.1 で示したように第 1 実験とは異なり第 2 実験での DMSO の ATP 発光量の施設間差が小さかったことが、この SI 値のばらつきが小さい結果を導いたと考えられる。

4.5 本研究の限界と今後の課題

本研究にもいくつかの限界がある。以下にこのことについて記載する。

被験物質数について

本研究の結果、LLNA-DA 法は良好な施設間再現性を示した。しかしながら、第 2 実験で用いた被験物質数はわずか 5 物質のみであり、第 1 実験とあわせても 14 物質である。今後は、提案施設を中心に、より多くの物質での実験を行った結果が必要であろう。

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していない。

また、ATP の測定器はすべての施設で同一の機器（キッコーマン、LUMITESTER C-100）を用いた。測定器の違いが結果に与える影響は評価できていない。この点は本研究の範囲外である。

5. 結論

統一された SOP に基づき、LLNA 法や GPMT/BT 法で結果が知られている 5 物質を用いて 7 実験実施施設による施設バリデーション研究を実施した。7 施設すべてが、この研究を通して考案された試験法の実施のしやすさの基準に適合し、一定の基準を満たす施設と判定された。5 物質の結果はいずれも高い施設間再現性を示した。これらの結果から LLNA-DA 法は実施しやすい試験法であると考えられる。

被験物質として金属塩をふくめることによって LLNA-DA 法は金属塩にも使用可能であることを確認した。溶媒として DMSO を用いることができるが、その場合には十分に塗布操作に注意する必要がある。また、DMSO そのものがリンパ節増殖能を有する可能性があることにも注意すべきである。

良好な施設間再現性は技術研修を行ったことに依存していると考えられるため、新たに LLNA-DA 法を導入する施設は十分かつ適切な実験方法の習得を行うべきである。

謝辞

本研究は日本動物実験代替法学会の協力を得ました。本研究に対する理解と支援に感謝いたします。

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

中村未央(株式会社薬物安全性試験センター)、萩原沙織(株式会社薬物安全性試験センター)、森光二(トーアエイヨー株式会社)、高野奈緒美(トーアエイヨー株式会社)、片倉由紀子(トーアエイヨー株式会社)、宮坂純子(ピアス株式会社)、高木裕美(ピアス株式会社)、判治貴之(ピアス株式会社)、西村郁美(日本新薬株式会社)、蛭田仁(日本新薬株式会社)、中村愛(参天製薬株式会社)、神尾一三(参天製薬株式会社)、廣井聡(参天製薬株式会社)、中村伸昭(ホーユー株式会社)、永池美香(石原産業株式会社)、乾公正(石原産業株式会社)

参考文献

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

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

- OECD (2002) Organization for Economic Co-operation and Development – OECD guidelines for testing of chemicals. No. 429: Skin sensitization: Local lymph node assay.
- OECD (2005) Organization for Economic Co-operation and Development – OECD series on testing and assessment. No. 34: Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment.
- Ryan, C. A., Cruse, L. W., Skinner, R. A., Dearman, R. J., Kimber, I. and Gerberick, G. F. (2002) Examination of a vehicle for use with water soluble materials in the murine local lymph node assay. *Food and Chemical Toxicology* 40, 1719–1725.
- Sailstad, D. M., Hattan, D., Hill, R. N. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. I. the ICCVAM review process. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 34, 249–257.
- Scholes, E. W., Basketter, D. A., Sarll, A. E., Kimber, I., Evans, C. D., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C. and Waite, S. J. (1992) The local lymph node assay: Results of a final inter-laboratory validation under field conditions. *Journal of Applied Toxicology* 12, 217–222.
- Warbrick, E. V., Dearman, R. J., Basketter, D. A. and Kimber, I. (1999) Influence of application vehicle on skin sensitization to methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone: an analysis using the local lymph node assay. *Contact Dermatitis* 41, 325–329.
- Wright, Z. M., Basketter, D. A., Blaikie, L., Cooper, K. J., Warbrick, E. V., Dearman, R. J. and Kimber, I. (2001) *International Journal of Cosmetic Science* 23, 75–83.
- 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 (2007) 「動物実験代替法のバリデーションにおける transferability の統計的評価方法に関する研究」東京理科大学工学研究科工学修士学位請求論文 2006 年度 (平成 18 年度) .
- 三浦新, 今泉益正 (1968) 管理図. 日本規格協会.