添付資料４

ダイセル化学工業株式会社からの追加資料

2007年　11月8日

LLNA‐DA法バリデーション研究における追加資料
被験物質の溶媒中での安定性に関する検討結果

ダイセル化学工業株式会社
評価・解析センター
出原賢治、津野真澄

【背景および目的】

LLNA-DA 法バリデーション実行委員会により実施された多施設間バリデーション研究では、第 1 実験、第 2 実験共に、被験物質をコード化した後、試料等手配担当者により 3 濃度の溶液または懸濁液に調製され、それを各施設に送付して評価する方法が採られた。従って、被験物質を調製した後、動物に適用するまでの間に一定の保存期間があったことになる。これに対し、2007 年 8 月 1 日に実施された評価委員会において、各被験物質の溶媒中での保存安定性の確認が必要であるとの指摘がなされた。

そこで、バリデーション研究に用いられた 14 物質の内、最も安定性が疑問視される物質について、使用した溶媒中での経時変化を調査することとした。

【方法】

調査する被験物質は小島　肇氏（JaCVAM）と協議の結果、3-Aminophenol（3-AP）、Abietic acid、Hexylcinnamic aldehyde（HCA）の 3 物質とした。3-AP と Abietic acid は 14 物質中で化学的に最も不安定と予想された。特に 3-AP は、各施設での冷蔵保存中に析出が認められ、評価委員会においても安定性が最も疑問視された被験物質である。HCA は比較的安定であると言われているが、第 1 実験、第 2 実験を通して全 17 施設で評価した被験物質であることから、調査対象に加えた。

バリデーション研究においては、被験物質は各施設で動物が入荷する週に合わせて調製、送付された。翌週に動物への適用が開始され、翌々週には 4 回目の塗布が終了する日程で使用されている。従って、溶媒中での経時変化を確認する期間は 3 週間とした。

被験物質溶液または懸濁液の送付は冷蔵条件で行われた。また、各施設においては、使用時以外は冷蔵（0℃～10℃、より望ましくは 2℃～8℃）で保管することが SOP に定められている。即ちバリデーション研究においては、調製後の溶液または懸濁液は原則としては冷蔵で保管され、調製作業、梱包作業、塗布操作など一時的には室温に置かれていたと考えられる。そこで、冷蔵（4℃）と室温（25℃）の 2 つの温度条件における経時変化を確認することとした。

バリデーション研究においては、被験物質はそれぞれ 3 用量に調製された。経時変化の調査は、バリデーション研究と同じ溶媒を使用し各々の最高用量の濃度に調製した試料について実施した。即ち、3-AP は 10%の AOO 溶液、Abietic acid および HCA は 25%の AOO 溶液を調査対象とした。

試料の調製方法、分析方法の詳細は添付資料「試験報告書（E-398)」に記した。

【結果の要約】

結果の詳細は添付資料「試験報告書（E-398）」に記した。

今回調査対象とした3種の被験物質は、冷蔵条件、室温条件共に3週間の間、AOO溶媒中において安定であることが確認された。従って、LLNA-DA法バリデーション研究においても試験結果に影響を与えるような被験物質の濃度低下は起こらなかったものと考えられる。

【添付資料】

試験報告書（E-398）

以上

評価・解析センター

研開 TL	責任者

試 験 報 告 書

(E-398)

作成：2007 年 10 月 2 日

ダイセル化学工業株式会社

1. 表題

LLNA-DA 試験サンプルの安定性試験

2. 試験目的

LLNA-DA 法バリデーション研究で用いた被験物質の、溶媒中での安定性についての知見を得る。

3. 試験番号

E-398

4. 被験物質

名称	CAS No.	試薬会社(Lot No.)
3-アミノフェノール(3-AP)	591-27-5	和光純薬製　和光一級　(LTJ4286)
アビエチン酸	514-10-3	和光純薬製　(LDQ 0632)
α-ヘキシルシンナムアルデヒド(HCA)	101-86-0	和光純薬製　和光一級　(WKQ3938)

5. 試験条件

試験濃度…アビエチン酸: 25%(w/v)、HCA: 25%(w/v)、3-AP :10%(w/v)

試験溶液…アセトン/オリーブオイル=4/1(v/v)溶液(以下、AOO 溶液と称す)

(アセトン:関東化学製　Lot.810Y3052、オリーブオイル:ヨシダ製薬製　製造番号 LL-2)

試験温度…4±2℃、25±2℃

試験期間…約 3 週間

6. 試験方法

(1) アビエチン酸、HCA

被験物質 2.5g を 10mL メスフラスコに精密に秤り取り、AOO 溶液を加えて溶解し、定容した。この試験液0.5mLを25mLメスフラスコに量り取り(0日目のサンプリング)、HPLC 用 THF で定容した液 1mL を 50mL メスフラスコに量り取り、アセトニトリルで定容し、HPLC 分析により濃度を求めた。この 0 日目のサンプリングを行った後、試験液を半量になるようにサンプル瓶 2 つに小分けし、4℃及び 25℃で保存し、適時サンプリングを行い、濃度の経時変化を見た。

＜アビエチン酸、HCA の安定性試験＞

(2) 3-AP

被験物質 100mg を 1mL メスフラスコに精密に秤り取り、AOO 溶液を加えて溶解し、定容した(9 個)。このメスフラスコの 1 つを 0 日目用とし、残りの 4 個ずつを 4℃及び 25℃で保存した。濃度測定の際には、試験液の入ったメスフラスコの内容物を HPLC 用 THF で 10mL メスフラスコに洗い込み、定容した液 1mL を 100mL メスフラスコ

に量り取り、超純水で定容し、HPLC 分析により濃度を求めた。

試験液

↓ 1)サンプリング日に10mLメスフラスコに洗い込み、
HPLC用THFでメスアップ
2)THF定容液の1mLを100mLメスフラスコに量り取り、
超純水でメスアップ

試料C

HPLC分析

＜3-AP の安定性試験＞

7. 試料 A 及び C 中の被験物質の分析方法

試料 A 及び C の分析方法を以下に示した。

(1) 分析装置

Waters Alliance system (Waters 製)

本体	: 2695 セパレーションモジュール
カラムオーブン	: カラムヒーター/クーラー
検出器	: 2487 デュアル UV/VIS 検出器
データ処理ソフト	: Empower^{TM}2

(2) 分析条件

① 試料 A

カラム	: Atlantis T3 3 μm (ϕ 2.1mm×150mm) (Waters 製)
カラム温度	: 40℃
溶離液	: 0.1%TFA 水溶液 / 含 0.1%TFA アセトニトリル=25/75
流　量	: 0.2mL/min
検　出	: アビエチン酸；UV240nm、HCA；UV280nm
注 入 量	: 5 μL

② 試料 C

カラム	: Atlantis T3 3 μm (ϕ 2.1mm×150mm) (Waters 製)
カラム温度	: 40℃
溶離液	: 0.1%TFA 水溶液 / 含 0.1%TFA アセトニトリル=98/2
流　量	: 0.2mL/min
検　出	: UV210nm
注 入 量	: 5 μL

(3) 標準液の調製

① アビエチン酸・HCA

各被験物質をアセトニトリルに溶かした液を分析用標準液とした。

② 3-AP

被験物質を超純水に溶かした液を分析用標準液とした。

8. 試験結果

各被験物質の経時変化の結果を表 1～3 及び図 1～3 に、代表的なクロマトグラムを図 4～6 に示した。

9. 考察及び結論

いずれの被験物質及び温度条件においても 3 週間の間、安定であることが確認できた。
以上より、今回試験した 3 種の被験物質について、本条件下では安定であり、LLNA-DA 法バリデーション研究における試験結果に影響を与えるような、被験物質の濃度低下はなかったものと考えられる。

10. 表及び図

表 1-1 アビエチン酸の濃度経時変化(25℃)
初期濃度：250.044g/L

経過日数(日)	標準液濃度(mg/L)	標準液面積値(μV·s)	試料 A 面積値(μV·s)	試料A濃度*1(mg/L)	試験液濃度*2(g/L)	保持率*3(%)
0	99.2	3376034	3434758	100.9	252.25	100.9
3	96.1	3293850	3454311	100.8	252.00	100.8
8	100.2	3226994	3384455	105.1	262.75	105.1
15	96.8	3133834	3258916	100.7	251.75	100.7
22	101.3	3337634	3275941	99.4	248.50	99.4

表 1-2 アビエチン酸の濃度経時変化(4℃)
初期濃度：250.044g/L

経過日数(日)	標準液濃度(mg/L)	標準液面積値(μV·s)	試料 A 面積値(μV·s)	試料A濃度*1(mg/L)	試験液濃度*2(g/L)	保持率*3(%)
0	99.2	3376034	3434758	100.9	252.25	100.9
3	96.1	3293850	3504215	102.2	255.50	102.2
8	100.2	3226994	3440618	106.8	267.00	106.8
15	96.8	3133834	3451137	106.6	266.50	106.6
22	101.3	3337634	3503357	106.3	265.75	106.3

$$*1: 試料A濃度(mg/L) = \frac{試料A面積値(\mu V\cdot s)}{標準液面積値(\mu V\cdot s)} \times 標準液濃度(mg/L)$$

$$*2: 試験液濃度(g/L) = \frac{\dfrac{試料A濃度(mg/L)}{1000(mg/g)}}{希釈倍率2500}$$

$$*3: 保持率(\%) = \frac{試験液濃度(g/L)}{初期濃度250.044(g/L)} \times 100$$

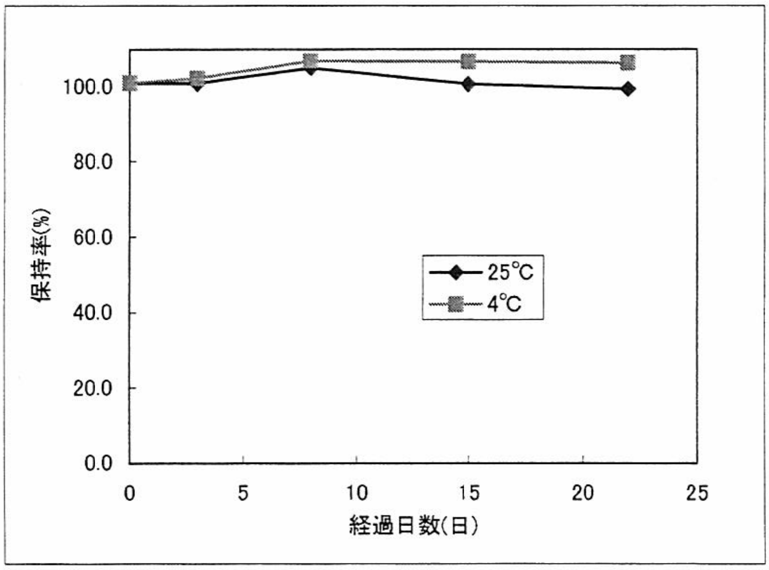


図 1 アビエチン酸の濃度経時変化

表 2-1　HCA の濃度経時変化(25℃)
初期濃度：250.043g/L

経過日数(日)	標準液濃度(mg/L)	標準液面積値(μV・s)	試料 A 面積値(μV・s)	試料A濃度*1 (mg/L)	試験液濃度*2 (g/L)	保持率*3 (%)
0	110.6	15647271	13864225	98.0	245.00	98.0
3	103.1	13947325	14236017	105.2	263.00	105.2
8	109.0	15374237	14208493	100.7	251.75	100.7
15	107.0	14730241	14200291	103.2	258.00	103.2
22	104.0	14525574	14032345	100.5	251.25	100.5

表 2-2　HCA の濃度経時変化(4℃)
初期濃度：250.043g/L

経過日数(日)	標準液濃度(mg/L)	標準液面積値(μV・s)	試料 A 面積値(μV・s)	試料A濃度*1 (mg/L)	試験液濃度*2 (g/L)	保持率*3 (%)
0	110.6	15647271	13864225	98.0	245.00	98.0
3	103.1	13947325	14360613	106.2	265.50	106.2
8	109.0	15374237	13891921	98.5	246.25	98.5
15	107.0	14730241	14080034	102.3	255.75	102.3
22	104.0	14525574	14034343	100.5	251.25	100.5

*1：$\text{試料A濃度(mg/L)} = \dfrac{\text{試料A面積値}(\mu\,\text{V}\cdot\text{s})}{\text{標準液面積値}(\mu\,\text{V}\cdot\text{s})} \times \text{標準液濃度(mg/L)}$

*2：$\text{試験液濃度(g/L)} = \dfrac{\dfrac{\text{試料A濃度(mg/L)}}{\text{1000(mg/g)}}}{\text{希釈倍率2500}}$

*3：$\text{保持率(\%)} = \dfrac{\text{試験液濃度(g/L)}}{\text{初期濃度250.043(g/L)}} \times 100$

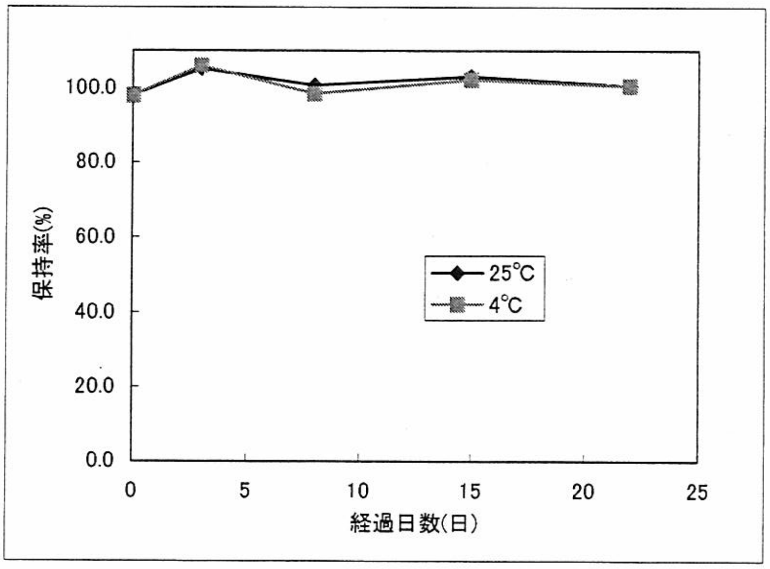


図 2　HCA の濃度経時変化

表 3-1　3-AP の濃度経時変化(25℃)

経過日数 (日)	標準液濃度 (mg/L)	標準液面積値 (μV・s)	仕込量 (mg)	試料 C 面積値 (μV・s)	回収量*1 (mg)	保持率*2 (%)
0	102.2	7424060	99.92	7307732	100.6	100.7
2	95.8	7180795	99.73	7278296	97.1	97.4
7	96.8	7011922	100.04	7357095	101.6	101.6
14	103.0	7687670	100.68	7324762	98.1	97.4
21	99.4	7396330	100.65	7131906	95.8	95.2

表 3-2　3-AP の濃度経時変化(4℃)

経過日数 (日)	標準液濃度 (mg/L)	標準液面積値 (μV・s)	仕込量 (mg)	試料 C 面積値 (μV・s)	回収量*1 (mg)	保持率*2 (%)
0	102.2	7424060	99.92	7307732	100.6	100.7
2	95.8	7180795	100.37	7467677	99.6	99.2
7	96.8	7011922	100.06	7495463	103.5	103.4
14	103.0	7687670	99.93	7352630	98.5	98.6
21	99.4	7396330	100.01	7351448	98.8	98.8

*1：$\text{回収量(mg)} = \dfrac{\text{試料C面積値}(\mu\text{V}\cdot\text{s})}{\text{標準液面積値}(\mu\text{V}\cdot\text{s})} \times \text{標準液濃度(mg/L)} \times 0.1\text{(L)} \times 10$

*2：$\text{保持率(\%)} = \dfrac{\text{回収量(mg)}}{\text{仕込量(mg)}} \times 100$

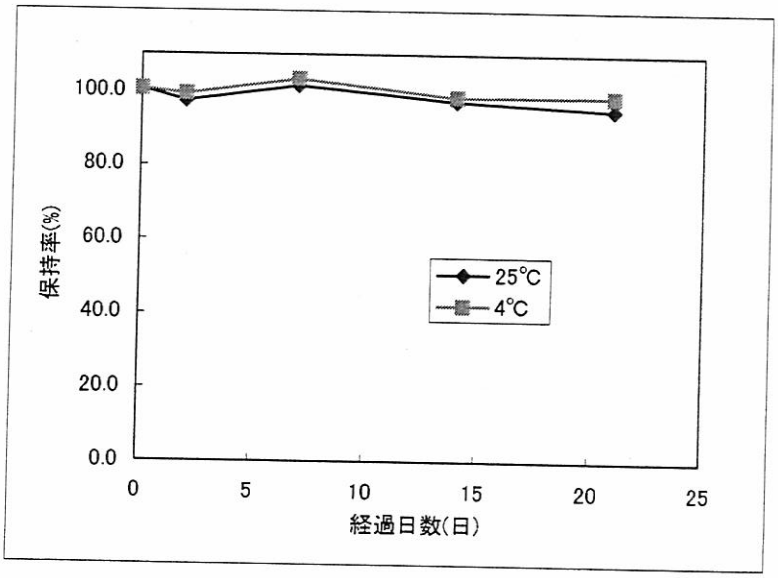
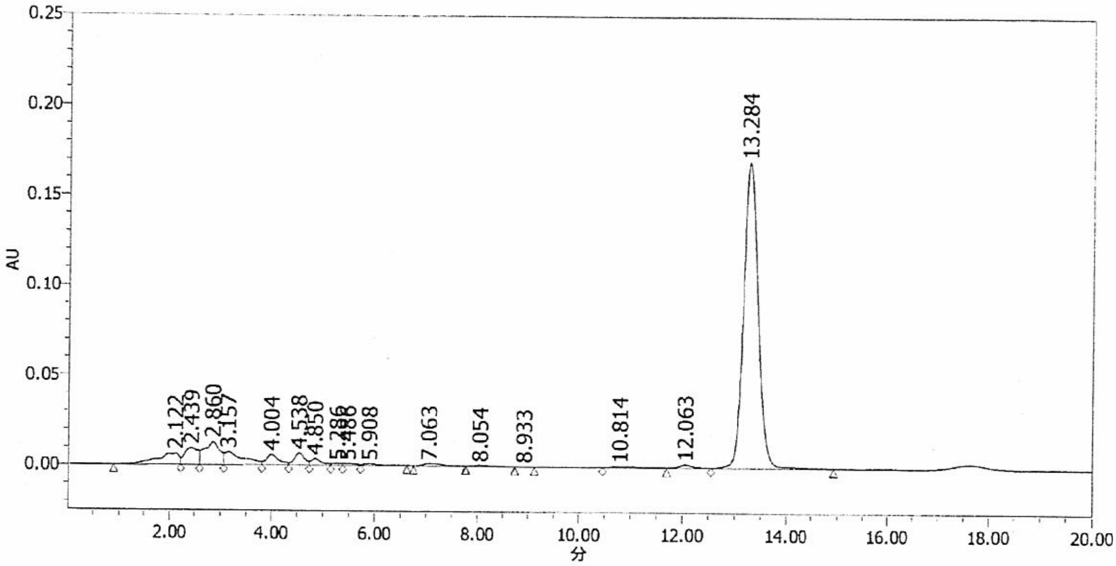


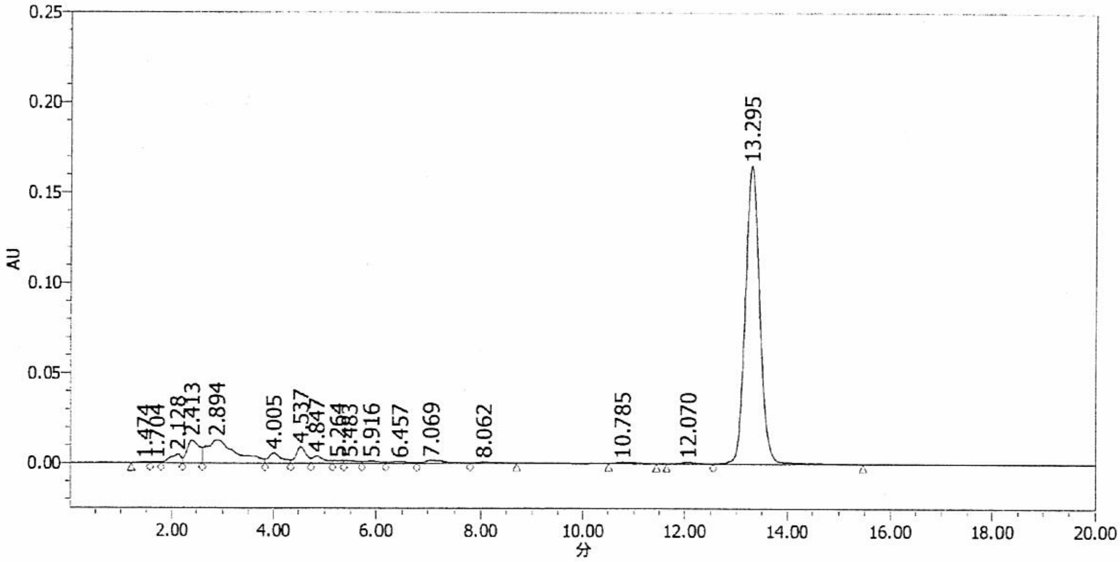
図 3　3-AP の濃度経時変化



	保持時間 (分)	面積 (μV秒)	高さ (μV)	%面積
1	2.122	188494	6389	4.16
2	2.439	177066	9333	3.90
3	2.860	262749	12617	5.79
4	3.157	185137	7302	4.08
5	4.004	99414	5971	2.19
6	4.538	93414	6790	2.06
7	4.850	52812	3567	1.16
8	5.286	11977	908	0.26
9	5.486	15683	899	0.35
10	5.908	17597	758	0.39
11	7.063	30632	1350	0.68
12	8.054	11616	596	0.26
13	8.933	560	51	0.01
14	10.814	20052	638	0.44
15	12.063	31696	1751	0.70

	保持時間 (分)	面積 (μV秒)	高さ (μV)	%面積
16	13.284	3337634	169835	73.57

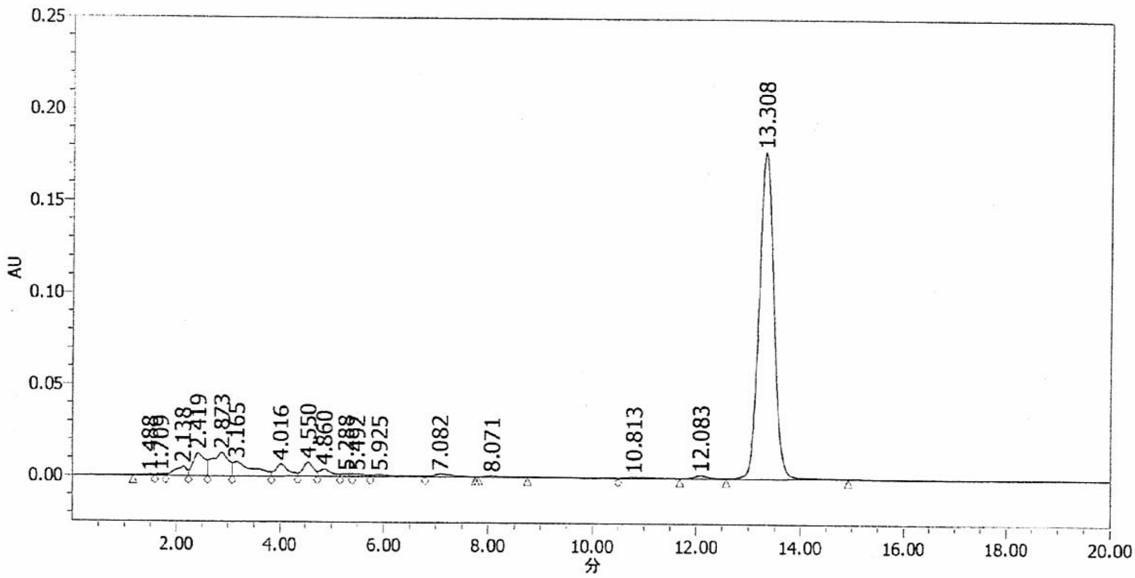
図 4-1　アビエチン酸の HPLC クロマトグラム(22 日目、101.3mg/L 標準液)



	保持時間(分)	面積(μV秒)	高さ(μV)	%面積
1	1.474	3573	310	0.08
2	1.704	5268	506	0.12
3	2.128	72744	4932	1.61
4	2.413	216623	12628	4.78
5	2.894	496086	12664	10.95
6	4.005	98602	5563	2.18
7	4.537	122218	8941	2.70
8	4.847	60809	3834	1.34
9	5.264	15709	1246	0.35
10	5.483	23252	1223	0.51
11	5.916	23403	1123	0.52
12	6.457	22202	951	0.49
13	7.069	39359	1551	0.87
14	8.062	17009	816	0.38
15	10.785	19869	719	0.44

	保持時間(分)	面積(μV秒)	高さ(μV)	%面積
16	12.070	18846	1034	0.42
17	13.295	3275941	165439	72.29

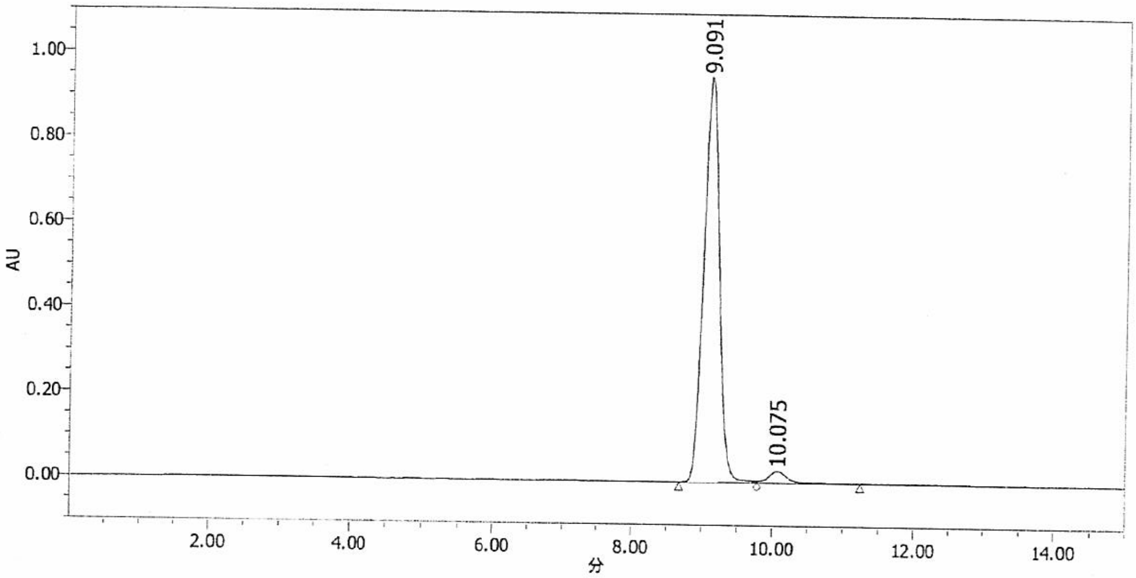
図 4-2　アビエチン酸の HPLC クロマトグラム(22 日目、25℃)



	保持時間 (分)	面積 (μV秒)	高さ (μV)	%面積
1	1.488	3397	292	0.07
2	1.709	4991	482	0.11
3	2.138	72651	4920	1.55
4	2.419	191951	12238	4.09
5	2.873	280483	12518	5.97
6	3.165	196184	7729	4.18
7	4.016	108498	6371	2.31
8	4.550	103562	7517	2.20
9	4.860	62029	3846	1.32
10	5.288	15864	1182	0.34
11	5.492	20678	1154	0.44
12	5.925	35619	1012	0.76
13	7.082	36674	1503	0.78
14	8.071	13236	661	0.28
15	10.813	19805	630	0.42

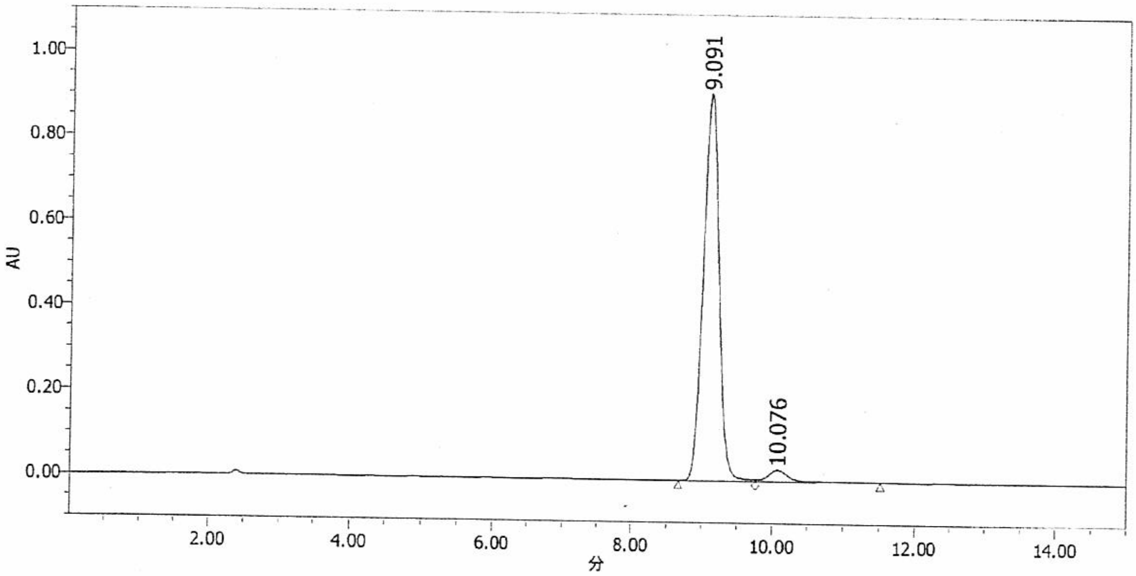
	保持時間 (分)	面積 (μV秒)	高さ (μV)	%面積
16	12.083	28541	1591	0.61
17	13.308	3503357	178355	74.58

図 4-3　アビエチン酸の HPLC クロマトグラム(22 日目、4℃)



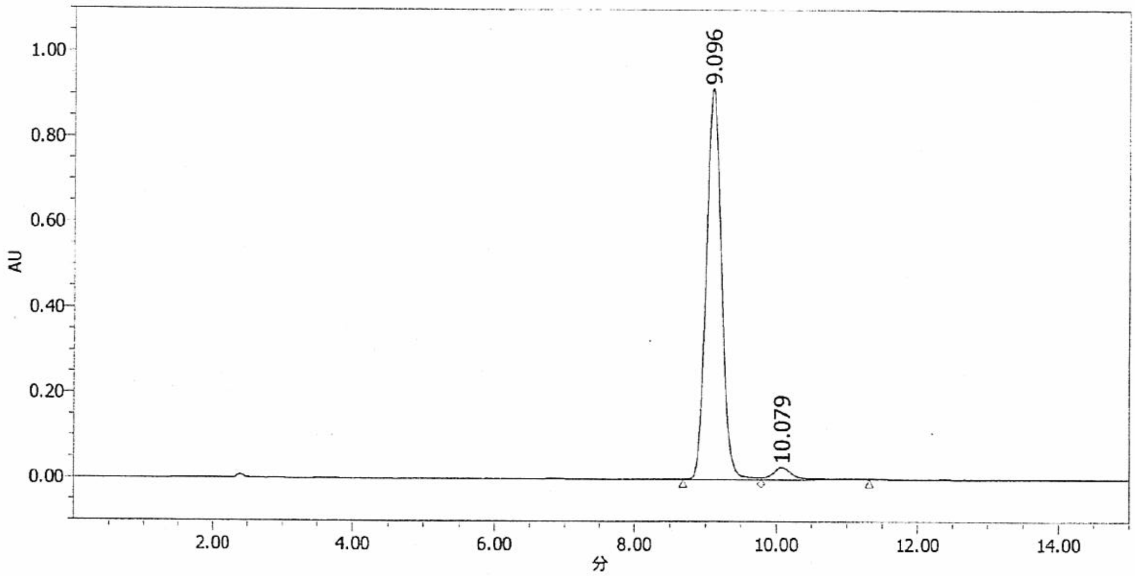
	保持時間(分)	面積(μV秒)	高さ(μV)	%面積
1	9.091	14525574	956003	96.50
2	10.075	527450	27752	3.50

図 5-1　HCA の HPLC クロマトグラム(22 日目、104.0mg/L 標準液)



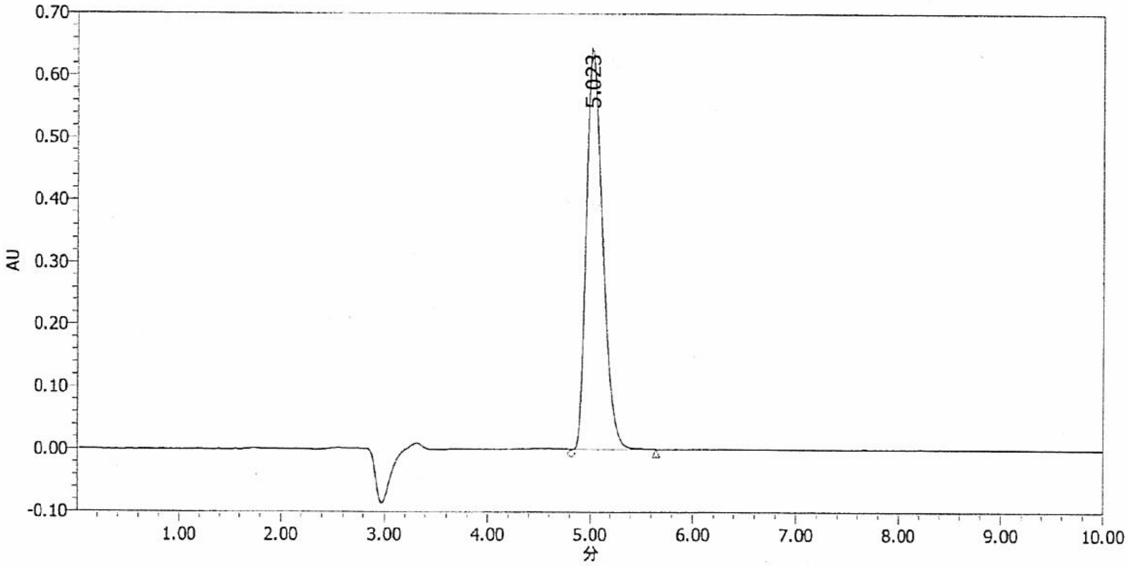
	保持時間(分)	面積(μV秒)	高さ(μV)	%面積
1	9.091	14032345	916076	96.38
2	10.076	527724	27239	3.62

図 5-2　HCA の HPLC クロマトグラム(22 日目、25℃)



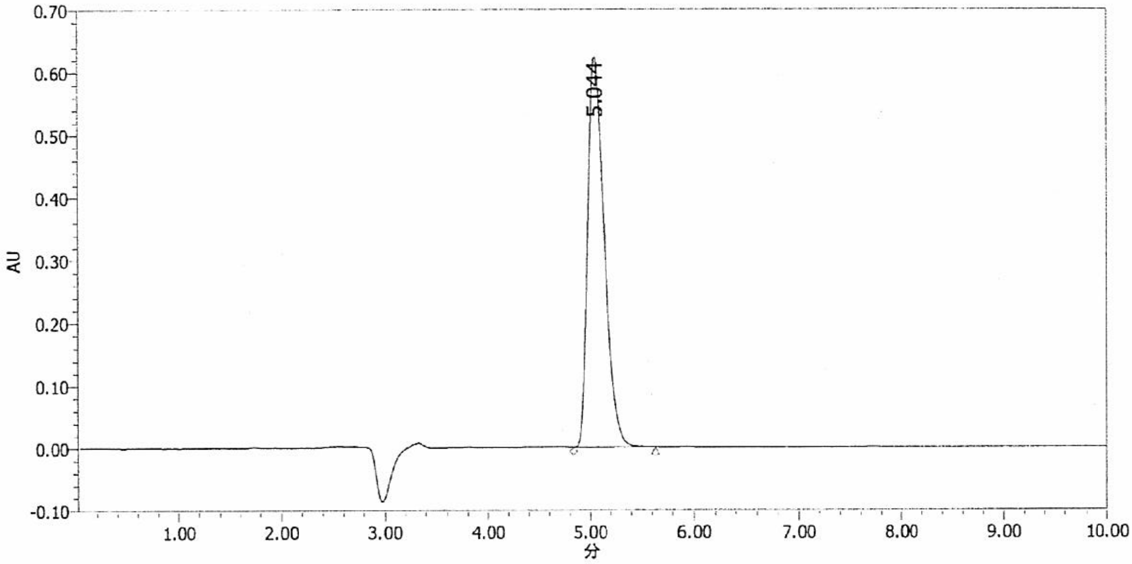
	保持時間(分)	面積(μV秒)	高さ(μV)	%面積
1	9.096	14034343	916932	96.35
2	10.079	531801	28128	3.65

図 5-3　HCA の HPLC クロマトグラム(22 日目、4℃)



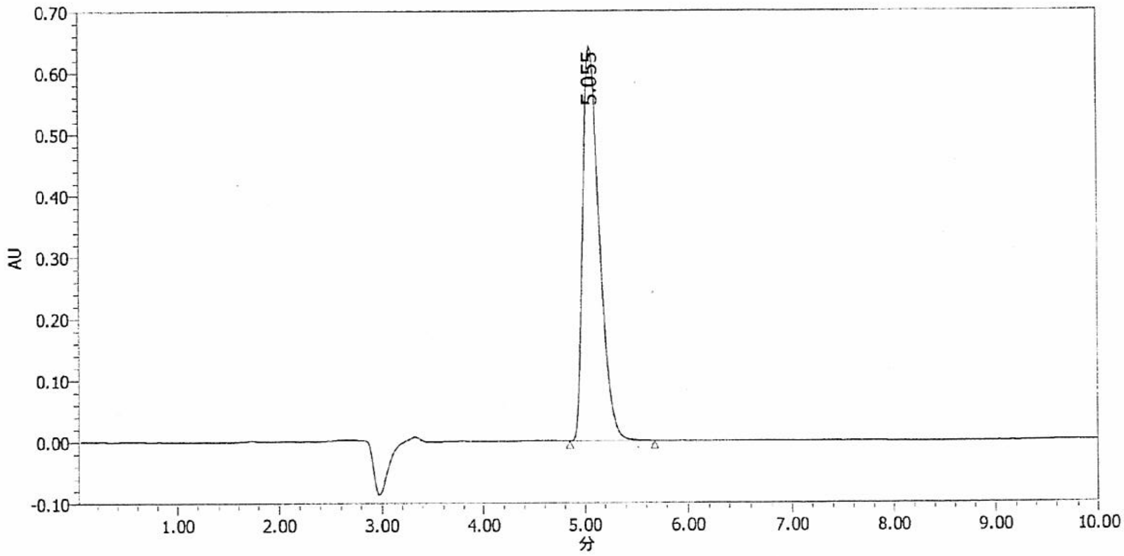
	保持時間(分)	面積(μV秒)	高さ(μV)	%面積
1	5.023	7396330	647096	100.00

図 6-1　3-AP の HPLC クロマトグラム(21 日目、99.4mg/L 標準液)



	保持時間 (分)	面積 (μV秒)	高さ (μV)	%面積
1	5.044	7131906	624283	100.00

図 6-2　3-AP の HPLC クロマトグラム(21 日目、25℃)



	保持時間 (分)	面積 (μV秒)	高さ (μV)	%面積
1	5.055	7351448	643428	100.00

図 6-3　3-AP の HPLC クロマトグラム(21 日目、4℃)

2007年　11月8日

LLNA - DA法による31物質の評価結果

ダイセル化学工業株式会社

評価・解析センター

出原賢治

【背景】

2004 年 1 月 15 日に提出した「代替試験法申請書類　皮膚感作性試験：LLNA-DA 法」では、資料 6：LLNA-DA 試験結果において、17 物質の評価結果を提示した。その後行われた評価委員会では、陰性の物質が少なかったことが指摘され、一次評価報告書では、施設内バリデーションでの被験物質の選択はほぼ適切であるが、陰性物質を含めたより多くの被験物質での追加検討の必要であるとされている。

LLNA-DA 法バリデーション実行委員会により実施された多施設間バリデーション研究では、第 1 実験、第 2 実験を通じて 14 物質が評価された。

これと平行し、弊社では一般に良く知られた物質で、LLNA や GPMT、ヒトでの皮膚感作性試験等による結果が報告されているものについて評価を継続して実施してきた。

施設内バリデーションの結果として、計 31 物質の評価結果を提示する。

【結果の要約】

評価した 31 物質を表 1 に纏めた。内 17 物質は既に「代替試験法申請書類　皮膚感作性試験：LLNA-DA 法」で提示したものである。

弊社において実施した 31 物質の LLNA-DA法による試験結果を表 2 に纏めた。31 物質中、22 物質が陽性、9 物質が陰性であった。

LLNA-DA 法による試験結果のまとめと、他の試験法による結果との比較を表 3 に纏めた。

31 物質の評価結果に基づき、LLNA-DA 法の感度、特異度、予測性、一致率を、表 4-1、4-2、4-3 に纏めた。LLNA の結果に対する一致率は 93%（κ=0.850）、GPMT/BA の結果に対する一致率は 80%（κ=0.525）、HMT/HPTA の結果に対する一致率は 79 %（κ=0.377）であった。

以上

LLNA; local lymph node assay
GPMT; guinea pig maximization test
BA; Buehler assay
HMT; human maximization test
HPTA; human patch test allergen.

表 1　被験物質リスト

被験物質名		CAS RN
2,4-Dinitrochlorobenzene	DNCB	97-00-7
p-Phenylenediamine		106-50-3
Tolylene-2,4-diisocyanate	TDI	584-84-9
Glutaraldehyde		111-30-8
Potassium dichromate	K2Cr2O7	7778-50-9
Pthalic anhydride		85-44-9
Trimellitic anhydride	TMA	552-30-7
Formaldehyde		50-00-0
Cinnamic aldehyde		104-55-2
Isoeugenol		97-54-1
Cobalt (II) chloride	CoCl2	7646-79-9
Eugenol		97-53-0
Resorcinol		108-46-3
Benzocaine		94-09-7
Abietic acid		514-10-3
Hexylcinnamic aldehyde	HCA	101-86-0
Mercaptobenzothiazol		149-30-4
Citral		5392-40-5
Hydroxycitronellal		107-75-5
Imidazolidinyl urea		39236-46-9
Sodium lauryl sulfate	SLS	151-21-3
Nickel (II) sulfate hexahydrate	NiSO4	10101-97-0
Benzalkonium chloride		8001-54-5
Propyl 4-hydroxybenzoate	Propyl paraben	94-13-3
Diethylphthalate		84-66-2
1-Bromobutane		109-65-9
Methysalicylate		119-36-8
Chlorobenzene		108-90-7
Lactic acid		50-21-5
Hexane		110-54-3
Isopropanol	IPA	67-63-0

表 2　LLNA-DA 法による 31 物質の評価データ

Chemicals	Vehicle	%	Lymph node weight(mg) Average ± S. E.	SI ± S. E.		ATP content(RLU) Average ± S. E.	SI ± S. E.		EC3
DNCB	AOO	0	3.35 ± 0.63	1.00 ± 0.19	-	2975 ± 1315	1.00 ± 0.44	-	0.05
		0.05	6.88 ± 0.16	2.05 ± 0.05	**	8903 ± 1444	2.99 ± 0.49	*	
		0.1	8.05 ± 0.53	2.40 ± 0.16	**	9541 ± 2709	3.21 ± 0.91	*	
		0.25	19.65 ± 1.98	5.86 ± 0.59	**	25618 ± 7677	8.61 ± 2.58	*	
		0.5	26.11 ± 1.97	7.79 ± 0.59	**	36673 ± 7175	12.33 ± 2.41	**	
		1	32.83 ± 1.20	9.79 ± 0.36	**	36682 ± 3410	12.33 ± 1.15	**	
p-Phenylenediamine	AOO	0	4.14 ± 0.64	1.00 ± 0.16	-	2894 ± 827	1.00 ± 0.29	-	0.07
		0.1	7.15 ± 0.78	1.73 ± 0.19	**	10302 ± 1449	3.56 ± 0.50	**	
		0.25	9.81 ± 1.02	2.37 ± 0.25	**	14864 ± 1916	5.14 ± 0.66	**	
		0.5	8.51 ± 1.40	2.06 ± 0.34	**	12115 ± 3028	4.19 ± 1.05	**	
		1	8.09 ± 0.81	1.96 ± 0.20	**	9085 ± 2222	3.14 ± 0.77	**	
Tolylene diisocyanate	AOO	0	4.07 ± 0.15	1.00 ± 0.04	-	2818 ± 491	1.00 ± 0.17	-	0.05
		0.05	8.43 ± 1.36	2.07 ± 0.34	*	8972 ± 2259	3.18 ± 0.80		
		0.1	11.97 ± 1.05	2.94 ± 0.26	**	15632 ± 2173	5.55 ± 0.77	*	
		0.25	18.90 ± 2.05	4.65 ± 0.51	**	27393 ± 2161	9.72 ± 0.77	**	
Glutaraldehyde	ACE	0	3.48 ± 0.31	1.00 ± 0.09	-	1611 ± 367	1.00 ± 0.23	-	0.10
		0.05	3.57 ± 0.21	1.03 ± 0.06		1978 ± 151	1.23 ± 0.09		
		0.1	5.50 ± 1.05	1.58 ± 0.30	*	4743 ± 1636	2.94 ± 1.02		
		0.25	7.87 ± 1.71	2.26 ± 0.49	**	10396 ± 4328	6.45 ± 2.69		
K2Cr2O7	DMSO	0	6.92 ± 0.94	1.00 ± 0.14	-	64899 ± 16192	1.00 ± 0.25	-	0.14
		0.1	12.48 ± 1.20	1.80 ± 0.17	**	167954 ± 22252	2.59 ± 0.34	**	
		0.3	17.06 ± 1.57	2.46 ± 0.23	**	289546 ± 79591	4.46 ± 1.23	*	
		1	22.56 ± 3.90	3.26 ± 0.56	**	356437 ± 63595	5.49 ± 0.98	**	
Trimellitic anhydride	AOO	0	3.48 ± 0.44	1.00 ± 0.13	-	3362 ± 638	1.00 ± 0.19	-	0.17
		0.1	5.76 ± 0.81	1.65 ± 0.23		8272 ± 2311	2.46 ± 0.69	*	
		0.25	6.81 ± 0.46	1.96 ± 0.13	**	12045 ± 1319	3.58 ± 0.39	*	
		0.5	9.15 ± 0.96	2.63 ± 0.28	**	16670 ± 1884	4.96 ± 0.56	**	
Pthalic anhydride	AOO	0	3.48 ± 0.44	1.00 ± 0.13	-	3362 ± 638	1.00 ± 0.19	-	<0.1
		0.1	7.26 ± 1.00	2.09 ± 0.29	*	12272 ± 730	3.65 ± 0.22	*	
		0.25	7.42 ± 0.91	2.13 ± 0.26	*	11294 ± 3187	3.36 ± 0.95		
		0.5	10.21 ± 2.17	2.93 ± 0.62	**	19731 ± 4968	5.87 ± 1.48	**	
		1	11.14 ± 2.13	3.20 ± 0.61	**	23037 ± 6535	6.85 ± 1.94		
Formaldehyde	ACE	0	3.52 ± 0.57	1.00 ± 0.16	-	2711 ± 712	1.00 ± 0.26	-	1.16
		0.1	3.93 ± 0.31	1.12 ± 0.09		3730 ± 1056	1.38 ± 0.39		
		0.25	4.94 ± 0.50	1.40 ± 0.14	*	4731 ± 1345	1.75 ± 0.50		
		0.5	5.18 ± 0.43	1.47 ± 0.12	*	4019 ± 1246	1.48 ± 0.46		
		1	6.18 ± 1.57	1.76 ± 0.45	*	7456 ± 2763	2.75 ± 1.02		
		2.5	9.42 ± 0.48	2.68 ± 0.14	**	13833 ± 3018	5.10 ± 1.11	*	
Cinnamic aldehyde	AOO	0	4.55 ± 0.27	1.00 ± 0.06	-	4411 ± 614	1.00 ± 0.14	-	2.98
		1	7.34 ± 1.05	1.61 ± 0.23	*	9199 ± 2896	2.09 ± 0.66		
		2.5	8.86 ± 0.75	1.95 ± 0.17	**	11743 ± 2030	2.66 ± 0.46	**	
		5	11.86 ± 0.41	2.61 ± 0.09	**	19502 ± 1914	4.42 ± 0.43	**	
		15	16.74 ± 1.95	3.68 ± 0.43	*	20848 ± 2649	4.73 ± 0.60	**	
Isoeugenol	AOO	0	4.19 ± 0.01	1.00 ± 0.00	-	3528 ± 1536	1.00 ± 0.44	-	2.35
		2.5	6.73 ± 0.87	1.61 ± 0.21		10982 ± 3313	3.11 ± 0.94	*	
		5	9.48 ± 1.05	2.26 ± 0.25	*	15473 ± 3601	4.39 ± 1.02	*	
		10	14.59 ± 1.16	3.48 ± 0.28	**	23869 ± 658	6.77 ± 0.19	**	
		25	21.72 ± 0.48	5.18 ± 0.11	**	43598 ± 4834	12.36 ± 1.37	**	
		50	20.31 ± 2.15	4.85 ± 0.51	**	37359 ± 6445	10.59 ± 1.83	**	
CoCl2	DMSO	0	5.98 ± 0.96	1.00 ± 0.16	-	6674 ± 1322	1.00 ± 0.20	-	3.27
		1	10.11 ± 0.38	1.69 ± 0.06	**	14270 ± 2434	2.14 ± 0.36	**	
		2.5	11.99 ± 0.66	2.01 ± 0.11	**	18117 ± 495	2.71 ± 0.07	**	
		5	15.61 ± 2.59	2.61 ± 0.43	**	24298 ± 4910	3.64 ± 0.74	**	

表 2（続き）

Chemicals	Vehicle	%	Lymph node weight(mg) Average ± S. E.	SI ± S. E.		ATP content(RLU) Average ± S. E.	SI ± S. E.		EC3
Eugenol	AOO	0	4.37 ± 0.20	1.00 ± 0.05	-	3871 ± 298	1.00 ± 0.08	-	4.50
		5	7.32 ± 0.25	1.67 ± 0.06	**	12533 ± 2216	3.24 ± 0.57	*	
		10	10.19 ± 1.35	2.33 ± 0.31	**	18535 ± 3149	4.79 ± 0.81	**	
		25	12.79 ± 0.73	2.92 ± 0.17	**	27372 ± 1383	7.07 ± 0.36	**	
Resorcinol	AOO	0	4.71 ± 0.46	1.00 ± 0.10	-	4907 ± 568	1.00 ± 0.12	-	6.44
		5	6.81 ± 0.44	1.45 ± 0.09	**	12099 ± 293	2.47 ± 0.06	**	
		10	10.47 ± 1.53	2.22 ± 0.32	**	21230 ± 3686	4.33 ± 0.75	*	
		25	9.99 ± 1.61	2.12 ± 0.34	**	17211 ± 5344	3.51 ± 1.09		
Benzocaine	AOO	0	3.39 ± 0.34	1.00 ± 0.10	-	2580 ± 448	1.00 ± 0.17	-	6.57
		5	5.94 ± 0.89	1.75 ± 0.26	**	6766 ± 3039	2.62 ± 1.18		
		10	7.12 ± 0.64	2.10 ± 0.19	**	9857 ± 1071	3.82 ± 0.42	**	
		25	6.72 ± 0.63	1.98 ± 0.19	**	12480 ± 5623	4.84 ± 2.18		
Abietic acid	AOO	0	3.83 ± 0.15	1.00 ± 0.04	-	3014 ± 378	1.00 ± 0.13	-	7.90
		5	5.87 ± 0.59	1.53 ± 0.16	*	6752 ± 2018	2.24 ± 0.67		
		10	7.55 ± 0.11	1.97 ± 0.03	**	10701 ± 1977	3.55 ± 0.66	*	
		25	11.28 ± 0.19	2.95 ± 0.05	**	18857 ± 1464	6.26 ± 0.49	**	
Hexyl cinnamic aldehyde	AOO	0	4.37 ± 0.20	1.00 ± 0.05	-	3871 ± 298	1.00 ± 0.08	-	11.62
		5	4.69 ± 0.71	1.07 ± 0.16		5005 ± 1676	1.29 ± 0.43		
		10	7.94 ± 0.83	1.82 ± 0.19	*	9981 ± 1947	2.58 ± 0.50	*	
		25	12.84 ± 0.95	2.94 ± 0.22	**	25038 ± 5783	6.47 ± 1.49	*	
Imidazolidinyl urea	DMF	0	4.03 ± 0.47	1.00 ± 0.12	-	3428 ± 784	1.00 ± 0.23	-	18.77
		10	5.65 ± 0.70	1.40 ± 0.17	*	8084 ± 1474	2.36 ± 0.43	**	
		25	7.41 ± 0.18	1.84 ± 0.04	**	11848 ± 1655	3.46 ± 0.48	**	
		50	9.43 ± 0.69	2.34 ± 0.17	**	16010 ± 1404	4.67 ± 0.41	**	
Mercaptobenzothiazol	DMF	0	4.03 ± 0.47	1.00 ± 0.12	-	3428 ± 784	1.00 ± 0.23	-	N. C.
		10	4.86 ± 0.10	1.21 ± 0.02		6859 ± 907	2.00 ± 0.26	**	
		25	4.66 ± 0.74	1.16 ± 0.18		4601 ± 1864	1.34 ± 0.54		
		50	4.69 ± 0.04	1.17 ± 0.01		3675 ± 726	1.07 ± 0.21		
Citral	AOO	0	4.55 ± 0.27	1.00 ± 0.06	-	4411 ± 614	1.00 ± 0.14	-	15.63
		5	8.19 ± 1.34	1.80 ± 0.30	*	8706 ± 3005	1.97 ± 0.68		
		10	9.65 ± 1.04	2.12 ± 0.23	**	9304 ± 1335	2.11 ± 0.30	**	
		15	11.22 ± 1.07	2.47 ± 0.23	**	12814 ± 1054	2.91 ± 0.24	**	
		25	13.29 ± 2.17	2.92 ± 0.48	*	19426 ± 2270	4.40 ± 0.51	**	
Hydroxycitronellal	AOO	0	3.63 ± 0.54	1.00 ± 0.15	-	2151 ± 326	1.00 ± 0.15	-	13.74
		10	6.09 ± 0.43	1.68 ± 0.12	**	4862 ± 545	2.26 ± 0.25	**	
		25	10.51 ± 0.68	2.89 ± 0.19	**	11246 ± 1702	5.23 ± 0.79	*	
		50	11.26 ± 0.26	3.10 ± 0.07	**	12234 ± 2494	5.69 ± 1.16	*	
SLS	DMF	0	3.63 ± 0.51	1.00 ± 0.14	-	2668 ± 883	1.00 ± 0.33	-	8.28
		1	3.98 ± 0.57	1.10 ± 0.16		3515 ± 438	1.32 ± 0.16		
		2.5	5.17 ± 0.60	1.43 ± 0.17	*	6535 ± 1309	2.45 ± 0.49	*	
		5	6.13 ± 1.35	1.69 ± 0.37	*	6006 ± 2186	2.25 ± 0.82		
		10	6.73 ± 0.52	1.86 ± 0.14	**	9050 ± 1542	3.39 ± 0.58	**	
NiSO4	DMSO	0	5.98 ± 0.96	1.00 ± 0.16	-	6674 ± 1322	1.00 ± 0.20	-	N. C.
		1	6.71 ± 1.12	1.12 ± 0.19		9098 ± 1423	1.36 ± 0.21		
		2.5	7.75 ± 0.31	1.30 ± 0.05	*	14496 ± 5119	2.17 ± 0.77		
		5	8.68 ± 1.03	1.45 ± 0.17	*	12346 ± 2715	1.85 ± 0.41	*	
Benzalkonium chloride	AOO	0	3.41 ± 0.21	1.00 ± 0.06	-	1733 ± 76	1.00 ± 0.04	-	0.58
		0.5	5.37 ± 0.44	1.58 ± 0.13	**	4330 ± 1129	2.50 ± 0.65		
		1	7.97 ± 0.76	2.34 ± 0.22	**	9449 ± 1259	5.45 ± 0.73	*	
		2.5	8.76 ± 0.68	2.57 ± 0.20	**	10080 ± 1562	5.82 ± 0.90	*	

表 2（続き）

Chemicals	Vehicle	%	Lymph node weight(mg) Average ± S. E.	SI ± S. E.		ATP content(RLU) Average ± S. E.	SI ± S. E.		EC3
Propyl paraben	AOO	0	4.37 ± 0.20	1.00 ± 0.05	-	3871 ± 298	1.00 ± 0.08	-	N. C.
		5	4.25 ± 0.38	0.97 ± 0.09		4288 ± 894	1.11 ± 0.23		
		10	4.51 ± 0.62	1.03 ± 0.14		4390 ± 817	1.13 ± 0.21		
		25	4.19 ± 0.50	0.96 ± 0.11		4959 ± 1629	1.28 ± 0.42		
Diethylphthalate	AOO	0	3.63 ± 0.54	1.00 ± 0.15	-	2151 ± 326	1.00 ± 0.15	-	N. C.
		25	3.97 ± 0.57	1.09 ± 0.16		2336 ± 579	1.09 ± 0.27		
		50	3.80 ± 0.44	1.05 ± 0.12		1876 ± 457	0.87 ± 0.21		
		100	3.79 ± 0.55	1.04 ± 0.15		1745 ± 350	0.81 ± 0.16		
1-Bromobutane	AOO	0	3.63 ± 0.54	1.00 ± 0.15	-	2151 ± 326	1.00 ± 0.15	-	N. C.
		5	4.28 ± 0.37	1.18 ± 0.10		3154 ± 795	1.47 ± 0.37		
		10	3.95 ± 0.48	1.09 ± 0.13		1606 ± 531	0.75 ± 0.25		
		25	5.05 ± 0.85	1.39 ± 0.23		3539 ± 534	1.65 ± 0.25	*	
Methylsalicylate	AOO	0	4.37 ± 0.20	1.00 ± 0.05	-	3871 ± 298	1.00 ± 0.08	-	N. C.
		5	4.20 ± 0.40	0.96 ± 0.09		2773 ± 717	0.72 ± 0.19		
		10	4.92 ± 0.40	1.13 ± 0.09		3723 ± 1195	0.96 ± 0.31		
		25	5.14 ± 0.46	1.18 ± 0.11		4661 ± 598	1.20 ± 0.15		
Chlorobenzene	AOO	0	3.63 ± 0.54	1.00 ± 0.15	-	2151 ± 326	1.00 ± 0.15	-	N. C.
		5	3.92 ± 0.23	1.08 ± 0.06		1714 ± 460	0.80 ± 0.21		
		10	3.96 ± 0.03	1.09 ± 0.01		2342 ± 362	1.09 ± 0.17		
		25	6.48 ± 0.95	1.78 ± 0.26	**	5255 ± 1946	2.44 ± 0.90		
Lactic acid	DMSO	0	6.31 ± 1.09	1.00 ± 0.17	-	10204 ± 2395	1.00 ± 0.23	-	N. C.
		5	5.92 ± 1.02	0.94 ± 0.16		10582 ± 2726	1.04 ± 0.27		
		10	6.34 ± 0.09	1.00 ± 0.01		10841 ± 986	1.06 ± 0.10		
		25	6.05 ± 1.02	0.96 ± 0.16		9832 ± 2883	0.96 ± 0.28		
		50	6.15 ± 0.25	0.97 ± 0.04		10106 ± 1213	0.99 ± 0.12		
Hexane	AOO	0	3.87 ± 0.60	1.00 ± 0.15	-	3129 ± 735	1.00 ± 0.23	-	N. C.
		25	3.95 ± 0.67	1.02 ± 0.17		3377 ± 271	1.08 ± 0.09		
		50	4.22 ± 0.32	1.09 ± 0.08		2740 ± 243	0.88 ± 0.08		
		100	6.18 ± 0.43	1.60 ± 0.11	**	7226 ± 1331	2.31 ± 0.43	**	
Isopropanol	AOO	0	3.45 ± 0.32	1.00 ± 0.09	-	2115 ± 99	1.00 ± 0.05	-	N. C.
		10	3.34 ± 0.21	0.97 ± 0.06		2218 ± 632	1.05 ± 0.30		
		25	3.74 ± 0.42	1.08 ± 0.12		2288 ± 1099	1.08 ± 0.52		
		50	3.13 ± 0.84	0.91 ± 0.24		1801 ± 783	0.85 ± 0.37		

Data presented as meane±S. E., * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

ACE, acetone; AOO, acetone/olive oil(4:1, v/v); DMF, dimethylformamide; DMSO, dimethylsulfoxide; EC3, mathematically estimated concentration of chemical required to induce a 3-fold stimulation index (SI); NC, not calculated.

表 3　31 物質の判定結果のまとめおよび他の試験法による結果との比較

Chemicals	LLNA-DA	*LLNA	*GPMT/BA	*HMT/HPTA
2,4-Dinitrochlorobenzene	+	+	+	
p-Phenylenediamine	+	+	+	+
Tolylene diisocyanate	+	+		
Glutaraldehyde	+	+		
K2Cr2O7	+	+	+	+
Pthalic anhydride	+	+	+	
Trimellitic anhydride	+	+		
Formaldehyde	+	+	+	+
Cinnamic aldehyde	+	+	+	+
Isoeugenol	+	+	+	+
CoCl2	+	+	+	+
Eugenol	+	+	+	+
Resorcinol	+	+	-	+
Benzocaine	+	+/-	+	+/-
Abietic acid	+	+	+	+
Hexyl cinnamic aldehyde	+	+	+	
Mercaptobenzothiazol	-	+	+	+
Citral	+	+	+	+
Hydroxycitronellal	+	+	+	+
Imidazolidinyl urea	+	+	+	+
SLS	+	+	-	-
NiSO4	-	-	+	+
Benzalkonium chloride	+	-	-	+
Propyl paraben	-	-	-	+/-
Diethylphthalate	-	-		
1-Bromobutane	-	-		
Methysalicylate	-	-	-	-
Chlorobenzene	-	-	-	
Lactic acid	-	-	-	
Hexane	-	-		-
Isopropanol	-	-	-	

* K. E. Haneke, *et al.*, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, (2001) **34**, 274-286. LLNA, local lymph node assay; GPMT, guinea pig maximization test; BA, Buehler assay; HMT, human maximization test; HPTA, human patch test allergen.

表 4-1　LLNA-DA の検出力（vs. LLNA）

		LLNA Positive		LLNA Negative	
LLNA-DA	Positive	2,4-Dinitrochlorobenzene *p*-Phenylene diamine Cinnamaldehyde Isoeugenol Eugenol Abietic acid Imidazolidinyl urea Trimellitic anhydride Pthalic anhydride Glutaraldehyde Formaldehyde Hydroxycitronellal Resorcinol Toluene diisocyanate Hexylcinnamic aldehyde Citral $CoCl_2$ $K_2Cr_2O_7$ SLS	*19chemicals*	Benzalkonium chloride	*1chemical*
	Negative	Mercaptobenzothiazol	*1chemical*	1-Bromobutane Diethylphthalate Propyl paraben Methyl salicylate Chlorobenzene Lactic acid $NiSO_4$ Hexane Isopropanol	*9chemicals*

Comparison	No. of comparisons	Sensitivity	Specificity	Positive Predictivity	Negative Predictivity	Accuracy
LLNA-DA vs LLNA	30	95% (19 / 20)	90% (9 / 10)	95% (19 / 20)	90% (9 / 10)	93% (28 / 30)

$\kappa = 0.850$

LLNA, local lymph node assay

表 4-2　LLNA-DA の検出力（vs. GPMT/BA）

		GPMT/BA Positive	GPMT/BA Negative
LLNA-DA	Positive	*15chemicals* 2,4-Dinitrochlorobenzene *p*-Phenylenediamine Pthalic anhydride Formaldehyde Cinnamic aldehyde Isoeugenol Eugenol Abietic acid Hydroxycitronellal Imidazolidinyl urea Benzocaine $K_2Cr_2O_7$ $CoCl_2$ Hexylcinnamic aldehyde Citral	*3chemicals* Resorcinol SLS Benzalkonium chloride
	Negative	*2chemicals* Mercaptobenzothiazol $NiSO_4$	*5chemicals* Propyl paraben Methysalicylate Chlorobenzene Lactic acid Isopropanol

Comparison	No. of comparisons	Sensitivity	Specificity	Positive Predictivity	Negative Predictivity	Accuracy
LLNA-DA vs GPMT/BA	25	88% (15 / 17)	63% (5 / 8)	83% (15 / 18)	71% (5 / 7)	80% (20 / 25)

$\kappa = 0.525$

GPMT, guinea pig maximization test; BA, Buehler assay.

表 4-3　LLNA-DA の検出力（vs. HMT/HPTA）

		HMT/HPTA	
		Positive	Negative
LLNA-DA	Positive	*p*-Phenylenediamine *13chemicals* Formaldehyde Cinnamic aldehyde Isoeugenol Eugenol Resorcinol Abietic acid Citral Hydroxycitronellal Imidazolidinyl urea Benzalkonium chloride $K_2Cr_2O_7$ $CoCl_2$	SLS *1chemical*
	Negative	Mercaptobenzothiazol *3chemicals* $NiSO_4$ Propyl paraben	Methysalicylate *2chemicals* Hexane

Comparison	No. of comparisons	Sensitivity	Specificity	Positive Predictivity	Negative Predictivity	Accuracy
LLNA-DA vs HMT/HPTA	19	81% (13 / 16)	67% (2 / 3)	93% (13 / 14)	40% (2 / 5)	79% (15 / 19)

$\kappa = 0.377$

HMT, human maximization test; HPTA, human patch test allergen.