新規試験法提案書

# 皮膚感作性試験代替法（LLNA-DA 法）

平成 20 年 11 月

国立医薬品食品衛生研究所

# 新規試験法提案書

平成 20 年 11 月 4 日
No.　2008-02

## 皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA 法)の提案

平成 20 年 8 月 28 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：皮膚感作性試験代替法(LLNA：Local Lymph Node Assay-DA 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とを提案する。

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、日本動物実験代替法学会の組織する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（Skin sensitization: Local Lymph Node Assay）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「皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA 法)」の使用を提案するものである。

添付資料一覧

1．JaCVAM 評価会議報告書
2．皮膚感作性試験代替法（LLNA－DA 法）の評価報告書（第一次＆第二次評価）
3．LLNA-DA バリデーション研究報告書（第 1 次＆第 2 次実験）
4．ダイセル化学工業株式会社からの追加資料
5．代替試験法申請書　皮膚感作性試験：LLNA－DA 法
6．OECD　429, OECD GUIDELINE FOR THE TESTING CHEMICALS, Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay
7．試験法公定化までの道程と JaCVAM の担当

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

井上　達

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 statement

## on the LLNA-DA for skin sensitization testing

At the meeting concerning the above method, held on 28 August 2008 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) -DA coordinated by Japanese Society for Alternative to Animal Experiments (JSAAE), it is concluded that the LLNA-DA 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

Director,
NCBSR,
NIHS,
Tokyo

4 November 2008

1. 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. Tohru Inoue (NIHS)
Mr. Makoto Hayashi (An-pyo Center*)
Mr. Noriho Tanaka (FDSC*)
Mr. Takemi Yoshida (Showa Univ.)
Ms Masako Mizoguchi (St. Marianna Univ. School of Medicine)
Mr. Fumio Sagami (Eisai Co., Ltd./JPMA*)
Ms Yuko Okamoto (KOSÉ Corporation/JCIA*)
Mr. Hiroshi Onodera (PMDA*)
Mr. Yoshiaki Ikarashi (NIHS)

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)
Mr. Kenichi Nakazawa (NIHS)
Mr. Hiroshi Itagaki (JSAAE)
Mr. Mitsuteru Masuda (JaCVAM)
Mr. Hajime Kojima (JaCVAM)

* An-pyo Cneter: Biosafety Research Center Food, Drugs and Pesticides
FDSC: Food and Drug Safety Center
PMDA: Pharmaceuticals and Medical Devices Agency
JPMA: Japan Pharmaceutical Manufacturers Association
JCIA: Japan Cosmetic Industry Association

# 皮膚感作性試験代替法(LLNA：DA 法)の評価会議報告書

JaCVAM 評価会議

平成 20 年（2008 年）10 月 30 日
平成 23 年（2011 年）4 月 20 日改定

JaCVAM 評価会議

井上　達（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）
林　　真（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）
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）
溝口昌子（聖マリアンナ医科大学）
佐神文郎（エーザイ株式会社／日本製薬工業協会）
岡本裕子（株式会社コーセー／日本化粧品工業連合会）
小野寺博志（医薬品医療機器総合機構）
五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所　環境衛生化学部）

任期：平成 19 年 1 月 1 日～平成 20 年 12 月 31 日

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）
中澤憲一（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）
板垣　宏（日本動物実験代替法学会会長）

任期：平成 19 年 1 月 1 日～平成 20 年 12 月 31 日

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

以上

皮膚感作性試験代替法 LLNA(Local Lymph Node Assay ) : DA 法について、第三者評価委員会からの報告を受け[1)]、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[2)]。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。

バリデーション結果は、論文としてアカデミックに公表されている[3)]。独立した専門家による第三者評価機関によって評価されている[1)]。

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。

ゴールドスタンダードである LLNA[4)] で評価されている対照毒性との感度、特異度が高く、従来の毒性試験と比較して十分である。GPMT（Guinean　Pig　Maximization　Test）と原理が違う。

免疫毒性の皮膚感作性の代替法として国際的に認められている LLNA の機能に匹敵（相当）する。

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。

ハザード評価に有用である。

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。

・　純度の高い化学物質は十分に広くカバーされている。
・　感作性の同定に有用である。
・　感作性物質の評価において、LLNA と同等程度の評価が可能である。
・　可溶性物質を対象とし、固体は適用できない。
・　感作性の評価は 31 物質（提案施設）で実施されている。
・　施設間差の評価は、14 物質で実施されているなど十分広く対象とされたものとなっている。

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。

・プロトコルに忠実であることが求められる。

試験法実施上に際して、投与回数を減らしたり、SLS（ラウリル硫酸ナトリウム）の適用がない場合に偽陰性が多くなる可能性があるので注意が必要である。

・系統、ＡＴＰ測定までの時間を注意することにより、プロトコルの頑健性が維持される。
・技術習得が容易である。

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。

・LLNA 原法と比べて、ＲＩを使わないことを含めて、操作時間と経費が軽減され、有用性がある。また、施設が限定されない。従って、行政的に用いられやすい。

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。

・ＲＩを使わないことにより、実施施設・試験実施者に制限がなく、廃棄物処理や環境汚染対策上の負担の低減に資するところが大きく、倫理的・経済的に大きな利点がある。

・静脈注射をしないことにより、作業と動物への苦痛レベルを軽減できる。

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、皮膚感作性試験代替法(LLNA：DA 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、化学物質の皮膚感作性を科学的に評価できると結論した。

参考文献


１．ダイセル化学工業株式会社より提案のあった皮膚感作性試験代替法（LLNA：DA 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．Omori, T. Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi , Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I., Yuasa, A.:, Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 58 11-26(2008)

４．OECD(2004) OECD guideline for the testing of chemicals, Test guideline: 429, Local Lymph Node Assay (LLNA)

添付資料２

# 皮膚感作性試験代替法（LLNA－DA 法）の評価報告書

ダイセル化学工業（株）より提案のあった

皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA 法)の一次評価報告書

日本動物実験代替法学会　評価委員会

委員長*

田中憲穂（食品薬品安全センター　秦野研究所）
大野泰雄（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）

副委員長

金澤由基子（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　療品部）
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）
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（ヤンセンファーマ（株）研究開発本部データ管理部）

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）

（所属は平成１７年３月３１日現在）
*: 2004 年１２月まで田中憲穂が、その後は大野泰雄が委員長を勤めた。

ダイセル化学工業（株）より提案のあった

皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA 法)の一次評価報告書


要旨

平成１５年度の厚生科学研究班の決定により、ダイセル化学工業（株）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-DA 法)を評価した。評価委員会では感作性試験評価ワーキンググループ(WG)を組織した。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、短時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ばらつき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

医薬品等の皮膚感作性は主にモルモットを用いたMaximization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。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$^{3}$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、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BrdUの取り込みをみる方法(Takeyoshi et al 2003)も報告されているが、未だ十分にバリデートされていない。一方、ダイセル化学工業（株）の山下と出原は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）に評価を依頼するため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年度より検討を行った。なお、本試験法については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、評価委員会で検討したのち、適切と判断された場合には施設間バリデーションを行うように勧告し、その結果を待って、再度評価することになる。

B．評価方法

B-1) 評価組織

従来の評価委員会は光毒性試験代替法の評価のために組織されたものであり、必ずしも感作性試験代替法の評価に適当では無かった。そこで、これとは別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を組織した。また、オブザーバーとして、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。

<u>評価委員会</u>

委員長

田中憲穂（食品薬品安全センター秦野研究所）2004年１２月まで

大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所・薬理部）2005年１月より

副委員長

大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所・薬理部　2005年12月まで）

金澤由基子（食品薬品安全センター秦野研究所・毒性部　2005年１月より）

委員

五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所・療品部）

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

提案者はダイセル化学工業（株）総合研究所　評価・解析センター　山下邦彦、出原賢治

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等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、既に論文等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、ダイセル化学工業（株）より提供を受けた資料、生データおよび集計データに基づいて評価した。な

お、ダイセル化学工業（株）から申請時に提供された資料は以下のとおり。

代替試験法申請書類、皮膚感作性試験：LLNA-DA 法、ダイセル化学工業（株）評価解析センター
資料１）代替しようとする試験法の名称および代替法の名称
資料２）LLNA に関する資料
資料３）LLNA-DA の原理
資料４）LLNA-DA のプロトコール
資料５）LLNA-DA で評価した被験物質リスト
資料６）LLNA-DA 試験結果
資料７）LLNA-DA の感度、特異性、予測性、一致率及びその他の特徴
資料８）LLNA-DA の特徴
資料９）その他、データ解析上有用な資料（生データ等）
資料８）論文（または、学会発表資料&印刷中の論文原稿）
添付資料 8-1)　出原賢治、山下邦彦、福田徳雄、山岸学、河田直紀，非-RI LLNA 試験法の検討、第１７回日本動物実験代替法学会発表資料 (2003. 11. 7)
添付資料 8-2)　出原賢治、山下邦彦、福田徳雄、山岸学、河田直紀，非-RI LLNA を用いた新規な化学物質の皮膚感作性評価、第１７回日本動物実験代替法学会発表資料 (2003. 11. 7)
添付資料 8-3)　非-RI LLNA 法の検討とリスクアセスメントへの応用、第１０回日本免疫毒性学会学術大会発表資料 (2003. 9. 25)
添付資料 8-4)　非 RI LLNA 法による皮膚感作性試験方法の検討と応用、第７６回日本産業衛生学会発表資料 (2003. 4. 23)
添付資料 8-5)　Yamashita K. et al, Development of modified local lymph node assay using measure as an endpoint, Alternatives to Animal T~~t~~esting and Experimentation （投稿中）
資料９）OECD guideline for the testing of chemicals 429, Skin sensitization: Local lymph node assay (adopted 24th April, 2002)
資料１０）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、以下の文書を参考資料として用いた。
1) ICCVAM, The Murine Local Lymph Node Assay: *A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds.* The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). February 1999.
2) OECD, Draft guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment (3rd version), 25 January 2005.

会議の記録、および申請後に提出された主な文書は以下のとおり。
1) 第一回LLNA-DA評価会議 (2004. 7. 20) 議事録
2) LLNA評価ワーキンググループ、LLNA-DA法についてのダイセルへの質問 (2004. 8. 14)
3) 出原賢治、山下邦彦、第１回評価委員会でのご質問に対する回答 (040917)
4) 第二回 LLNA-DA 評価委員会議 (2004. 10. 15) 議事録
5) 第三回 LLNA-DA 評価委員会議 (2005. 1. 25) 議事録
6) 出原賢治、山下邦彦、リンパ球サブクラスの解析結果報告 (2004. 12. 26)
7) LLNA 評価ワーキンググループ，リンパ球サブクラスへの影響の検討実験についてのコメント (2005. 1. 25)

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、光毒性試験代替法を評価したときの経験を基に事務局が作成した評価の要点（ダイセルより提案された皮膚感作性試験代替法 (LLNA-DA 法) の評価委員会での評価について）を参考に、申請者により提出された申請内容を評価した。委員より出された疑問点について申請者に問い合わせ、その回答を踏まえ一次評価を行った。なお、今回の申請では多施設によるバリデーション結果は添付されていないことから、最終評価は行えなかった。一次評価の結果多施設で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等が若干修飾される可能性があるが、その際は申請者の意向を尊重することとした。

評価委員会では平成１６年度において３回の会議を開催し、ダイセルより提供された申請資料を評価した。その結果はB-3)項に記載した議事録にまとめた。

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$^{3}$H-Methyl thymidineまたは$^{125}$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、溶媒対照群の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, OHSAも受け入れている。

しかし、リンパ節の細胞増殖反応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産生を見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い。

C-２）申請法について

C-2-1) LLNA-DA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）による抗原特異的なT-リンパ球の増殖を、耳介リンパ節を標的臓器とし、そのリンパ節におけるRI標識化合物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-DA法は細胞増殖を検出する指標をATPの検出に変更したものであり、基本的な原理にLLNA法と変わるところは無い

なお、LLNA-DA法はLLNAと同等の検出感度を得るために投与操作および日程に変更を加えている。この変更により感作誘導における原理が両者で異なるか否かについては評価委員会で特に審議した点であり，C-4)に詳述する。

C-2-2) LLNA-DA法のプロトコール

LLNA-DA法のプロトコールを以下に要約する。なお、参考のため、LLNA法の内容を括弧の中に示した。

使用動物：出産経験の無い雌CBN/JN系マウス　（同様の雌CBA/CaまたはCBA/J系マウス）

なお、CBA/JNマウスとは、日本チャールズリバーより購入したCBA/JNCrjマウスであり、CBA/Jと基本的に同等のマウスである。

投与群設定：溶媒を用いる陰性対照、陽性対照(10% Eugenol, または15% Hexyl cinnamic aldehyde)、およ

び３用量以上の被験物質　（同左、OECD は陽性対照として Hexyl cinnamic aldehyde と Mercaptobenzothiazole を推奨）

群あたり動物数：１群あたり３匹以上　（４匹以上）

なお、マウスは群飼いとしたが、処置部を他のマウスが傷害したり、被験物質をなめ合うことことは観察されておらず、群飼いが感作性に影響するといった問題は今のところ認識されていない。

溶媒：被験物質が最も良く溶け、あるいは懸濁できる溶媒を用いる。通常 Acetone/Olive oil (4:1, AOO), Dimethylformamide (DMF), Methyl ethyl ketone (MEK), Propylene glycol (PG), Dimethylformamide (DMSO) の順に選択する。(同左)

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　($^{3}$H-Methyl-thymidine または $^{125}$I-Deoxyuridine を静脈注射し、リンパ球に取り込まれた放射活性)

試験操作：LLNA-DA 法では 3 日間連続で 1% SDS 処置１時間後に被験物質溶液あるいは懸濁液をマウスの両耳介に塗布する。７日目（または６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。それを 0.5mL の PBS 中に入れ、洗い流す。これを撹拌し、膜組織を避けて 20μL サンプリングし、PBS 1.98mL 中に加え、ATP 測定試料とする。

４回目の塗布により、対照群と処置群との測定値の比 (SI 値) は顕著に増加する。これは抗原特異的な活性型リンパ球またはメモリー細胞が形成され、それらの急速な増殖が生じていることが考えられる。

（被験物質を３日間連続処置した後、６日目に $^{3}$H-Methyl-thymidine あるいは $^{125}$I-Deoxyuridine 溶液を尾静脈から注入し、５時間後にマウスを屠殺する。リンパ節を取り出し、群毎にプールし（個別データが必要な場合は個体別にプールする)、金属性メッシュ上で穏やかに押しつぶし、細胞懸濁液を調製する。これを PBS で２回洗浄した後、5% TCA 中で 18 時間静置した後、ペレットを 1mL の TCA に懸濁し、リンパ球増殖活性を RI の取り込み量を指標として評価する。)

即ち、LLNA-DA 法では４回目の処置を行うことが LLNA 法と大きく異なっている。

結果の判定：SI 値が３以上の時に、感作性陽性とする。(同左)

C-2-3) LLNA-DA 法の特徴

LLNA 法と比較し、LLNA-DA 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 $^{3}$H- Methyl tymidine の取り込みを測定するが、LLNA-DA 法では RI を使用しない方法として、ATP 含量の増加を指標とした。
2) LLNA 法は 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が、LLNA-DA 法は３日間連続投与後、７日目（または６日目）にも４回目の投与を行い、その翌日にリンパ球増殖を測定する。
3) LLNA-DA 法は投与の際に 1%SLS の前投与を行う。
4) リンパ節を摘出し、スライドグラスでつぶすことにより、迅速にリンパ細胞を懸濁できる。
5) 10% Eugenol の作用を９回の繰り返し実験で検討したが、いずれも SI3 以上の値を示し、再現性がある。
6) 感作性物質の識別性は LLNA 法とほぼ同じである。
7) RI 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。
8) ATP 含量を高感度かつ迅速な測定法であるルシフェリン・ルシフェラーゼ法で測定することから、結果が速やかに定量的データとして得られる。

C-2-4) 提案書に記載されたバリデーションの種類

提案者の施設で実施された試験で LLNA-DA 法のバリデーションが行われ、再現性や識別性が LLNA 法とほぼ同様と評価されている。また、提案者は生産現場で多くの化学物質について実際に試し、労働安全の立場で、良い結果が得られているとのことである。しかし、いずれも一施設での結果であり、公平な評価を行う上では多施設バリデーションの結果が必要である。

C-3) 申請者の行ったバリデーションの結果について

C-3-1) 被験物質の妥当性

被験物質は１７種類で、その内モルモット試験で陽性と判定されているものが 14 種類、陰性と判定されているものが３種類であった。

被験物質には、クロルベンゼン類（DNCB: 2,4-Dinitrochlorobenzene）、アミン類（pPDA: 4-Phenylenediamine)、カルボン酸 (Trimelitic anhydride、Abietic acid)、アルデヒド類 (cinnamic aldehyde, HCA: Hexylcinnamic aldehyde, Citral)、フェノール類 (Isoeugenol, Eugenol)、Urea 類 (Imidazolidinyl urea)、チオール類 (MBT: 2-Mercaptobenzothiazol)、金属 ($CoCl_2$, $NiSO_4$)、殺菌剤 (Propylparaben)、エステル (Methyl salicylate)、界面活性剤 (Benzalkonium chloride) 等、様々な種類の化学物質が含まれてい

た。

感作性の程度に関しては、非常に強い感作性物質であるDNCB, pPDA、比較的強い感作性物質としてCinnamic aldehyde, Isoeugenol を、中程度の感作性物質として Eugenol および、Abietic acid, Hexylcinnamic aldehyede, Citral, Benzocaine を、また、弱い感作性物質あるいは刺激性物質としてPropylparaben, Methyl salicylate, Benzalkonium chloride が選択されている。なお、LLNA で false negative となる $NiSO_4$ もリストに加えられている。

以上から、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、陰性物質が少なかったことが指摘された。なお、申請法が原法である LLNA 法と原理的に同じと考えた場合には小数の被験物質でも良いが、異なると判定された場合には独立した新規の感作性試験法として、より多くの被験物質で申請法の妥当性を明らかにする必要がある。

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-DA 法は LLNA と同じ結果が得られた。判定の一致率について $\kappa$ 係数で比較すると LLNA-DA 法と LLNA 法は 0.667、LLNA-DA 法と GPMT/BA は 0.463、LLNA-DA 法と HMT/HPTA 法は 0.316 であった。なお、ある基準では $\kappa$ 係数が 0.8 以上では非常に良い一致、0.6 以上では良い一致、0.4 以下ではあまり一致していないとされており、この基準では、LLNA 法との一致は良好であるが、モルモットやヒトでの試験法との一致はあまり良くないと判断される。陰性物質が少なかった事も影響していると考えられることから、今後は陰性物質も増やして追加検討する必要がある。

なお、MBT の結果が陰性であったが、Basketter ら(1992)、 また、DeJong 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。しかし、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 を超えていなかった。それ以上の濃度では逆に SI 値が低下している。LLNA 法と比べ、SI 値が低くなる理由は今のところ不明である。また、LLNA 法と同様に金属塩の検出感度は良くない。

界面活性剤 Benzalkonium chloride は LLNA で陰性、LLNA-DA 法で偽陽性を示した。このため、界面活性剤の中に LLNA-DA 法で偽陽性を示す物質が存在する可能性が考えられた。既に刺激性を有する界面活性剤の中に LLNA 法で偽陽性を示すものが知られており、それらは LLNA-DA 法でも偽陽性となる可能性がある。今後、界面活性剤について LLNA-DA 法を用いて検討する必要があると考えられる。LLNA 法あるいは LLNA-DA 法により刺激性と感作性の識別をどのように可能とするかについては、今後の重要な課題である。

表：１７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 | LLNA-DA | LLNA | GPMT/BA | HMT | HPTA |
|---|---|---|---|---|---|
| 2,4-Dinitrochlorobenzene | + | + | + | | |
| 4-Phenylenediamine | + | + | + | + | + |
| Trimelitic anhydride | + | + | + | | |
| Cinnamic aldehyde | + | + | + | + | + |
| Isoeugenol | + | + | + | | + |
| Eugenol | + | + | + | | + |
| Benzocaine | + | +/- | + | +/- | |
| Abietic acid | + | + | + | | + |
| Hexylcinnamic aldehyde | + | + | + | | |
| Citral | + | + | + | + | |
| Imidazolidinyl urea | + | + | + | | + |
| 2-Mercaptobenzothiazol | - | + | + | + | + |
| $CoCl_2$ | + | + | + | + | + |
| $NiSO_4$ | - | - - | + | + | + |
| Propyl paraben | - | - | - | +/- | + |
| Methyl salicylate | - | - | - | - | |
| Benzalkonium chloride | + | - | - | | + |

LLNA: Local lymph node assay, GPMT: Guinea-pig maximization test, BA: Buehler assay, HMT: human maximization test, HPTA: human patch test allergen.

C-3-3) データの信頼性

主たる提案者は皮膚感作性試験について 1997 年より経験がある。また、申請法には技術的に特に困難と思われる所は無い。従って、技術面でデータの信頼性に関する問題は無いと考えられる。また、申請者の属す

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いるものと思われた。プロトコールは適切に記述されており、施設内バリデーションの結果も適切にまとめられた。個別データの確認も行えた。これらのことから施設内バリデーションは「GLP 精神に準じて、試験が実施された」と見なして良いと考えた。但し、チェックしたデータは２次データであり、生データレベルでの確認は行っていない。試薬調製記録の確認も行っていない。従って、多施設バリデーションはコード化された被験物質をもちいて行い、データの信頼性を更に確認する必要がある。

C-3-4) 施設内再現性

Eugenol (10%) について、９回の繰り返し実験を行っていた。その結果によれば、リンパ節重量の対照群との比（SI 値）に大きな差は無く、また、その ATP 含量の SI 値は若干ばらついていたが、陽性物質の基準である SI 値３を超えていた。また、SI 値３を示す推定濃度(EC3)も３回の繰り返し実験で Eugenol では 5.09%, 5.59%, 4.23%、Isoeugenol では 3.40%, 2.28%, 2.46%と大きな差は無かった。以上より、申請法の陽性と陰性との識別における再現性は良いと判断される。

C-3-5) 施設間再現性

多施設でのバリデーションが実施されていないことから、判断できなかった。

C-3-6) 比較対照とした in vivo データの妥当性

Haneke ら(2001)や Basketter ら(1992)の適切な論文に掲載されたマウス、モルモット及びヒトでの実験結果と比較している。

C-3-7) 試験法の頑健性

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、頻繁に陽性対照を用いて試験を実施し、その反応性を確認する必要がある。また、ATP 含量測定に用いる試薬はメーカにより発光度や減衰が異なることから、予試験で定められた適切なプロトコールに厳密に従って実施する必要がある。

C-3-8) 動物福祉面からの妥当性

申請法は 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、動物に与えるストレスが少ない。また、LLNA と異なり尾静脈注射の段階が無く、動物の拘束や苦痛が少ない。また、使用動物数はモルモットを用いた Maximization 法などの従来法では１群５匹以上が要求されているが、申請法では３匹以上と少ない。これらのことから、申請法は従来法より動物福祉の面で優れていると考えられる。

C-3-9) 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、特にコストパー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、本法では RI 施設は必要なく、用いる ATP 測定装置は相対的に安価である。

C-3-10) 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 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 法も同様である。

C-４) 評価委員会で特に審議した問題点

C-4-1) LLNA-DA 法の位置づけについて

LLNA-DA 法は感作性試験の代替法としてではなく、LLNA 法の代替法として提案されたため、LLNA 法との原理面から見た同等性について懸念があった。そのため、LLNA-DA 法の 4 回目の投与によりリンパ球のサブクラス（T 細胞および B 細胞）がどの程度変化するかを調べ、両者の感作誘導法の質的な違いを検討した。その結果、いずれの被験物質においてもリンパ球の増殖が起こる中で B 細胞の増殖が起こり、それに伴って B 細胞の比率の増加が認められた。したがって、LLNA-DA 法と LLNA 法の感作誘導における差は主としてどれだけリンパ球を増殖させたかという違いで質的な差は少なく、原理的に見て LLNA-DA 法は LLNA 法の延長上と考えて良いと結論した。ただし、リンパ球の増殖における量的な違いは認められるので、LLNA 法との同等性についてはバリデーションでさらに検証していく必要があると考えられる。

C-4-2) LLNA-DA 法のプロトコールの問題点について

LLNA-DA 法のプロトコール上の問題点について検討した結果を以下に示す。

1）被験物質の4回目処置について

LLNA 法は被験物質を連続 3 日間処置するのに対し、LLNA-DA 法は 6 日目または 7 日目に 4 回目の処置を行う。このため感作誘導期の反応を捉えるとされている LLNA 法とは異なり、感作誘導期だけでなく誘発期の反応も加わってしまうことが懸念された。これについては以下のような意見があったが、最終的にエンドポイントとしている耳介局所のリンパ節に起こっている現象だけを捉えた場合，従来の LLNA 法と差がないという結論に至った。

感作誘発期の反応の影響は少ないとする意見：

①申請者の実験によると4回目の塗布において耳介に外見的に大きな変化は認められず、耳の反対側に Challenge したとき、免疫応答がでるのは 10 日目位からである。したがって、4 回目の塗布を行う時点では感作誘発期の反応の関与は少ないと考えられる。

②LLNA-DA 法を用いて4回目の投与後のリンパ球サブクラス(T 細胞および B 細胞)解析を行ったところ、LLNA-DA 法と LLNA 法の感作誘導で質的な差が少なかった。

感作誘発期の反応も加わっているとする意見：

①4 回目の塗布時に「惹起」というような反応が起こりうるか否かは被験物質の種類及び濃度によると考えられる。感作誘導期の反応の影響が現れないとは言い切れない。

②DNCB のように強い感作性物質では比較的早期に感作が成立して、LLNA-DA 法の 4 回目の投与の時点では惹起過程にあると推測している。リンパ球のサブクラス（T 細胞および B 細胞）解析のデータで DNCB における B 細胞が若干高いのは惹起反応であるかもしれない。

また、もし 4 回目の処置により B 細胞の増殖が過剰になると体液性免疫を検出する試験法であるマウス膝窩リンパ節試験（PLNA）との差がなくなり、細胞性免疫を検出する試験法としての位置づけが変わる懸念が指摘されたが、リンパ球のサブクラス（T 細胞および B 細胞）解析において LLNA 法と LLNA-DA 法で質的な差は少なく、B 細胞の過剰な増殖も認められなかったため、問題ないと結論した。

2）ATP 含量を細胞増殖の指標とした点について

ATP はリンパ節中の非増殖細胞中にも含まれており、ATP 含量の変化は必ずしも細胞増殖に平行しているものではない。また、周囲組織の ATP も一部測定されてしまう可能性もあるが、スライドグラス上での塗末によりリンパ細胞がうまく分散し、周囲組織を避けて採取できることから、その関与は少ないと考えられる。実際、申請法のプロトコールにより LLNA 法とほぼ同等の被験物質濃度で同様の SI 値が得られている。

3）Sodium lauryl sulfate (SLS)処置について

LLNA-DA 法は LLNA 法と異なり、1% SLS 溶液での前処理を行っている。SLS は LLNA 法で偽陽性となる。LLNA-DA でも同様に偽陽性であった。また、SLS が被験物質の反応に影響を与える可能性も考えられる。SLS の処置は被験物質の感作性評価において問題とならないかとの指摘があった。しかし、LLNA で反応が起こるのは、より高濃度の SLS で処置した場合であり、LLNA-DA 法では反応の起きない濃度を用いている。また、感作性を持たない被験物質が、1%SLS による僅かな細胞増殖活性が影響を与え、結果として偽陽性となるようなケースについての知見はない。一方、SLS でランゲルハンス細胞の遊走が増加するとされており、1% SLS の影響は Eugenol, Isoeugenol 及び HCA で約 20%の SI 値の増加が認められている。これは LLNA-DA 法の感度上昇に役立っており、結果として、LLNA と同様の SI 値と EC3 値が得られた。また、感作性物質の識別能も LLNA とほぼ同様であった。

なお、SLS はもともと水溶性の被験物質に適用するために用いられたものである。脂溶性の被験物質に用いることの意義に疑問があるとも指摘された。SI 値の閾値を下げることにより、SLS を使用しなくとも良いかも知れないとの指摘もあった。しかし、識別値を変えるとその値の妥当性の検討のために大きな追加実験を行わなくてはならなくなることから、実施困難であるし、今回の評価委員会の審議の範囲を超えるものであると考えられた。また、行政上は偽陰性を恐れることから、SLS 使用により多少偽陽性が増えても、それで試験法の感度が上がり、偽陰性が低下するのであれば、処置の意味はあると考えられた。

4）使用動物数について

使用動物数は LLNA 法では4匹以上であるが、申請法では3匹以上としている。ATP 含量のバラツキが大きいが1群3匹で十分であるか検討した。申請者は ATP 発光量のばらつきは、実験操作や ATP 測定法に起因するのではなく、リンパ節中の細胞数の実際のばらつき、即ち、試験における動物の個体差を反映したものであると考えている。個体差を生じる原因は、動物自身の感受性の差、さらには被検物質を耳介に塗布すると

言う実験操作に由来すると思われる。動物数は４匹以上がベターであろうが、３用量をとっていることから、３匹でも実用上の問題は起きていない。動物数を削減する意味からも、増やす事は好ましくないと考えた。しかし、3 匹で充分であることを示すには、３例で原法同様の精度(バラツキ)である事を示す必要がある。LLNA 法での４匹と、LLNA-DA 法での３匹とで EC3 値の点推定値と信頼区間が同程度であれば、３匹でも良いということになるが、今回の評価期間中にそれを示すのは困難であった。このように、LLNA の代替法とするならば例数を減らしてもよいという根拠を示す必要があるが、それを示すのは困難であることから、バリデーションの際は４匹以上を用いるのが良いとされた。

５）対照物質について

LLNA 法では陽性対照として HCA を使用しているが、LLNA-DA 法では Eugenol を使用している理由について申請者に問い合わせたところ次のような回答がなされた。

① OECD ガイドライン 429 では、HCA または Mercaptobenzothiazol を陽性対照物質として推奨し、SI が 3 を超え,かつ SI が大きくなり過ぎない用量で用いることとしている。但し,充分な根拠があれば、同等の感作性ランクの陽性対照物質を用いることも可能とされている。

② 当初 Eugenol を使用して検討を行ってきた経緯から、Eugenol の蓄積データが最も豊富であったため、陽性対照物質として採用した（10％用量では、SI=4.99±1.35（n=18））が、現在は HCA の蓄積データが揃ってきたため,HCA を陽性対照物質としている。15％用量で SI=4.08±0.91（n=13）である。このように、HCA は安定性に優れていると報告されているため,陽性対照物質としてはより望ましいと考えられる。

③ 陽性対照の反応は溶媒が同じで有る限り、大きな差が出たことは無い。

また、陽性対照はヒトに与える影響が大きいので、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が出た。また、当面は LLNA 法で使用されており、バリデーションに際しては、安定したデータが得られる HCA を陽性対照として用いるのが良いだろうとされた。

C-4-3）プロトコールは詳細かつ適切に書かれているか

プロトコールは詳細に記載されており、下に示した一部を除き問題無いと思われた。

1）SLS 塗布法について

SLS の塗布法が具体性に欠けるとの指摘に応じ、具体的な方法が示された。なお、ピペットマンを使用して一定量を投与することも不可能ではないが,水溶液であるため耳介表面になじみにくく、全体に均一に塗布するのが困難である。また塗布に時間を要する。これらのことを考慮し、LLNA-DA 法では筆による塗布を採用した。

2） ATP 測定法について

ATP 測定に影響する被験物質はないかとの質問があった。これに対し、1）細胞懸濁液を 100 倍希釈して用いることから、通常、残留した被験物質が直接発光に影響することは考えられない。しかし、2）ATP 合成を促進する薬物や阻害する薬物の場合は ATP 含量に影響するが、これらの場合はリンパ節重量の変動と合わせて評価することにより、判定できる、と回答された。

ATP 測定までの時間による影響や試薬のロット差について質問された。それに対し、ATP 測定の直線性、試薬差、ロット差、発光の時間経過、ATP の安定性に関するデータが示された。また、ATP 測定試薬は CAMBREX 社（LumiTech™ViaLight™H）と KIKKOMAN 社（ルシフェール 250 プラス）が使用可能である。発光量や減衰性はキット間やロット間で差がある。即ち、KIKKOMAN 社の方が発光量が１０倍位多いが、発光の減衰が早い。CAMBREX 社の製品では 1%/min 位の早さで減衰する。

具体的には、リンパ節摘出後 ATP 含量は経時的に低下することから、リンパ節摘出から発光測定までの操作は、概ね 20 分以内で終え,かつ、個体ごとの経過時間をできるだけ揃える事が望ましい。また、酵素(AMR)添加後は、発光量が急速に減少することから、酵素添加後はできるだけ時間を置かずに測定することが望ましい。測定は 1 サンプルずつ、酵素添加後直ちに行うとすれば、操作自体は数秒以内終わるため,実際上問題はない。また、100 倍希釈懸濁液をドライアイス/メタノール中で凍結させることにより ATP の低下が抑制される。KIKKOMAN 社の試薬では数秒で測定が終了するが、CAMBREX 社の試薬では約５分かかる。グループで作業する場合は CAMBREX 社の試薬が便利だが、一人で作業する場合は KIKKOMAN 社の試薬が使用しやすい。

C-4-4）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。記載された感作性強度区分は、既報の GPMT による感作性強度区分とヒトの感作性強度区分に基づくものであり、LLNA-DA 法の EC3 による感作性強度区分ではない。近年、LLNA 法の EC3 に基づく感作性強度区分が提案されており、それによると、EC3 が 0.1％未満のものを Extreme、0.1%≦EC3＜1%を Strong、1%≦EC3＜10%を Moderate、10%≦EC3≦

100%を Weak としている(Kimber et al 2003, Gerberick et al 2004)。この基準に従って、LLNA-DA 法で評価した感作性物質の強度区分と LLNA 法による既報の強度区分とを比較すると、両者はほとんど同じ分類になる。2-Mercaptobenzothiazol が偽陰性であることを除くと、一致しているかまたは Moderate と Weak 間の 1 区分の相違である。

C-4-5) 刺激性物質と感作性物質の識別について

Gerberick らは B220 細胞は感作性物質で増加し、刺激性物質では増加しないことを見出し、これを指標にして刺激性物質と感作性物質が区別できると報告している。今回ののリンパ球サブクラス解析データは刺激性物質の SLS により B220 細胞が増加しており、Gerberick らと反対の結論になる。この違いに関して申請者は今回のデータでは SLS の用量が 10%であるのに対し、Gerberick の実験は 20%SLS で実施されており、SLS の毒性により B220 細胞が増加しなかった可能性がある。また、刺激の強いものでは用量反応関係が崩れることがある。Gerberick らの論文の結論と食い違っているが、SLS で B 細胞が増加すると考えざるをえない。一方、内部データではあるが、15% SLS で B 細胞は増えていたとも報告された。

C－５）特許の状況

多くの方々に使用してもらうよう、特許出願していない。

D. 現時点での総合評価

1) 評価委員会では LLNA-DA 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、また、簡便かつ迅速に結果が得られるにも関わらず、原法である LLNA 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方法であると判断し、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と考えた。

2) LLNA-DA 法は、LLNA 法より主としてエンドポイント並びに投与操作、日程を変更しているが、エンドポイントの原理、リンパ球サブクラス（T 細胞および B 細胞）の解析結果及び得られた SI 値から見て、LLNA 法と原理的に異なる試験ではないと考えられる．ただし、ATP 含量の変化は必ずしも細胞増殖に平行していないことに由来する微妙なエンドポイントの違い、並びに感作誘導時のリンパ球の増殖における量的な違いなどが認められるので、LLNA 法との同等性についてはバリデーションでさらに検証していく必要があると考えられる。

3) LLNA 法と同様に金属類への感度が低い。また、刺激性を有する界面活性剤で偽陽性を出現させる可能性がある

4) 詳細なプロトコールが用意されている。また、今回の評価委員会の指摘を踏まえ、微細な修正が行われる予定である。

5) 結果の判定方法の妥当性については、SI 値３が識別値になるように、SLS 前処置を加えてある。その必要性については議論があったが、特に、感作性試験法として不適切とは言えない。

6) ATP 測定を決められた時間内に正確に行わなければならないが、その他の点については、比較的容易に実行できるものと思われる。

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）Core laboratory はダイセル化学に努めてもらい、プロトコールを作成してもらう。また、技術トランスファーを実施してもらう。

２）バリデーションに協力してもらう機関は LLNA 法を行ったことがあり、ATP 測定装置を有する機関とするのが良い。

３）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ー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検体まで可能であろう。

４）１群当りの動物数は LLNA-DA 法では３匹であるが、LLNA-DA 法は LLNA 法よりも動物数を減らすこと事を主眼とした代替法ではないこと、また、3 匹では１匹分のデータが使用不能になった場合に解釈が困難になることからも、LLNA 法に準じて４匹が良い。

５）用量段階は、公比１０、３用量で行うのが良い。

６）被験物質候補リストはダイセル化学工業（株）の協力を得て作成する。

７）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. 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, 1992.

Basketter DA, Gerberick GF, Kimber I, Loveless SE. The local lymph node assay: a viable alternative to currently accepted skin sensitization tests. Food Chem Toxicol. 34, 985-97, 1996.

De Jong WH, Tentij M, Spiekstra SW, Vandebriel RJ, Van Loveren H, Determination of the sensitising activity of the rubber contact sensitisers 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, 2002.

Haneke KE, Tice RR, Carson BL, Margolin BH, Stokes WS, ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. Data analyses completed by the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods. Reg. Toxicol. Pharmacol, 34, 274-286, 2001.

Gerberick GF, Cruse LW, Miller CM, Sikorski EE, Ridder GM. 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, A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. Contact Dermatitis, 50, 274-288, 2004.

Kimber I, Mitchell JA, Griffin AC, Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. Food Chem Toxicol. 24, 585-586, 1986.

Kimber I, Basketter DA, Butler M, Gamer A, Garrigue JL, Gerberick GF, Newsome C, Steiling W, Vohr HW, Classification of contact allergens according to potency: proposals. Food Chem Toxicol, 41, 1799-1809, 2003.

OECD: OECD guideline 429 Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, (adopted 24th April 2002)

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.

以上

ダイセル化学工業（株）より提案のあった
皮膚感作性試験代替法（LLNA-DA 法）の二次評価報告書

日本動物実験代替法学会　評価委員会

委員長*

田中憲穂（食品薬品安全センター　秦野研究所　遺伝毒性部）
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（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（サノフィ・アベンティス株式会社　統計解析室）
筒井尚久（三菱ウェルファーマ株式会社　創薬研究本部　安全性研究所）
手島玲子（国立医薬品食品衛生研究所　機能生化学部）
萩野滋延（（株）資生堂、品質保証センター）
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 7 月 30 日現在）

*: 平成 16 年 12 月まで田中憲穂が、その後は大野泰雄が委員長を務めた。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今回の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、二次評価には関与しなかった。

ダイセル化学工業（株）より提案のあった

# 皮膚感作性試験代替法（LLNA-DA 法）の二次評価報告書


要旨

ダイセル化学工業（株）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-DA 法）について、平成 17 年度の厚生労働科学研究班で一次評価が行われた。評価委員会は、本試験法の原法である 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、比較的短時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のばらつきについての情報を得る必要があった。そのため、多施設バリデーションの実施を日本動物実験代替法学会（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により 14 物質を用いた、17 施設でのバリデーション（第 1 実験：10 施設、第 2 実験：7 施設）が実施され、その報告を受けた評価委員会は二次評価を行った。その結果、本試験法の Stimulation Index（SI）値および感作性の有無における施設間再現性はおおむね良好であった。なお、被験物質の媒体への溶解状態に差がある場合は結果の再現性に影響する可能性が指摘された。また、第 1 実験における 12 被験物質による LLNA 法との対応性の検討結果は感度 87.5%、特異度 75%、正確性 83.3%と良い結果が得られた。第 2 実験の 5 被験物質については Cobalt chloride で施設間のばらつきにより感作性の有無の判定ができなかったが、他の 4 物質の判定は LLNA 法のものと一致した。

これらと申請者の自家試験結果を合わせて全 33 物質で評価した結果、感度、特異性、正確性はいずれも 90%以上であり、LLNA-DA 法は LLNA 法の代替として有用であるとの結論が得られた。

A．目的

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。最近、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 Guideline 429 Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, adopted 24th April 2002）。しかし、この方法は $^{3}$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、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）の取り込みをみる方法（Takeyoshi et al, 2003）も報告されているが、まだ、十分にバリデートされていない。一方、ダイセル化学工業（株）の山下と出原はATP含量を測定する方法（LLNA-DA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、かつ比較的短期間の方法であり、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、平成16年度より検討を行った。その結果、本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、LLNA-DA法バリデーション研究実行委員会を組織し、バリデーション研究を行った。本二次評価は、この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-DA法がLLNA法の代替法として妥当であるか否かを評価するものである。

B．評価方法

B-1）評価組織

一次評価書に記載した。

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今回の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、二次評価には関与しなかった。

B-2）提案者

一次評価書に記載した。

B-3）秘密の保持と評価結果の公表について

一次評価書と同一であることから省略

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) ダイセル化学工業（株）より提案のあった皮膚感作性試験代替法（LLNA-DA 法）の一次評価報告書

資料 2) LLNA-DA 法バリデーション研究報告書（概括）Version 10（2007.5.18）

資料 3) LLNA-DA 法バリデーション研究（第 1 実験）報告書 Version 2.1（2007.6.27）

資料 4) LLNA-DA 法バリデーション研究（第 2 実験）報告書 Version 1.1（2007.6.27）

資料 5) LLNA-DA 法バリデーション研究結果報告（説明資料）

資料 6) 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、2007.11.8）

資料 7) LLNA 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、2007.11.8）

資料８）平成１９年度第一回評価委員会議事録

資料９）平成１９年度第二回評価委員会議事録

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、代替法学会のバリデーション委員長であり、LLNA-DA 法バリデーション実行委員長である大森崇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-DA 法の再現性について評価を行った。また、今回のバリデーションの結果、および申請者であるダイセル化学工業（株）より提供を受けた資料を合わせて、LLNA 法の代替法としての評価を行った。

なお、多施設バリデーションへの参加施設および被験物質は以下のとおり。参加申し込み施設が多かったことから、2 回に分けてバリデーションが行われた。

B-6) バリデーション参加者および参加施設名（表１）

バリデーション参加施設は表１に示したように23施設であり、それぞれの施設の代表者は、LLNA-DA 法バリデーション実行委員として計画の立案、実行、データ解析に関与した。このうち、17施設が実験を行う施設となった。これは当初、バリデーション委員会が参加施設を公募したところ、19 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、代替法学会のバリデーション委員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2回の実験に分け、第1実験では10 施設、第2実験では7施設がこのバリデーション研究の実験を行う施設となった。

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 5 種の被験物質を表２に示した。

C．バリデーションの結果および考察

C-1) 被験物質の選択

第 1 実験では陽性物質 8 種 (A: 2,4-dinitrochlorobenzene、B: hexylcinnamic aldehyde、C: 3-aminophenol、D: glutaraldehyde、E: cobalt chloride、F: isoeugenol、G: formaldehyde、K: abietic acid)、陰性物質 4 種 (H: dimethyl isophthalate、I: isopropanol、J: nickel sulfate、L: methyl salicylate)が用いられた。

第2実験では陽性物質3種 (B:hexylcinnamic aldehyde、E:cobalt chloride とN: potassium dichromate)、陰性物質 2 種 (J: nickel sulfate、M: lactic acid)が用いられた。LLNA 法の文献値より、A、D は非常に強い感作性物質、E、G、N は強い感作性物質、B、C、F は中程度の感作性物質、K は弱い感作性物質、H、I、J、L、M は感作性陰性物質とされている。また、J は LLNA 法では陰性と報告されているが、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。

即ち、重複しているものを一つと数えると、陽性物質 9 物質、陰性物質 5 物質を用いており、評価委員会は LLNA-DA 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。しかし、LLNA 法との結果の対応性を含む、皮膚感作性試験としての全般的な能力を評価する上では不十分であり、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。

C-2) 被験物質の取り扱い

本バリデーション研究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るため調製から投与までに日数 (最大 20 日間) が経過していることが、被験物質の安定性の観点で注目された。バリデーション研究報告書ではこれに関連する考察が不足しており、評価委員会で考察することとした。被験物質調製時には高濃度の J (nickel sulfate)と K (abietic acid)を除いて残り全ての被験物質が溶解していたのに対し、投与時には 6 物質で析出、沈殿が生じていた。即ち、第 1 実験では、被験物質 C (3-aminophenol)、E (cobalt chloride)、H (dimethyl isophthalate)、I (isopropanol)、J (nickel sulfate)、K (abietic acid)において、送付前の調製時に認められなかった析出や沈殿が投与時に認められた (LLNA-DA 法バリデーション研究 (第 1 実験) 報告書　表 3.2.2.及び 3.3.1) 。その際、H (dimethyl isophthalate)と I (isopropanol)については施設により析出･沈殿の現れ方に差が認められた。また、E (cobalt chloride)と J (nickel sulfate)は、沈殿を超音波処理により溶解させて投与した施設と懸濁液で投与した施設があった。被験物質の調製時には溶解した物質が施設に送付され、析出、沈殿を生じ、その析出物が再溶解しづらくなる現象があったようである。これらにより、投与時の被験物質溶液が名目上の濃度より低下している可能性が考えられ、試験結果の検討の際には考慮しなければならないと考えられた。

溶媒の性質については、バリデーション研究 (第1実験) 報告書の20ページには「被験物質を入れた容器がプラスチックであったため、溶媒としてacetone/olive oil (AOO)を用いると容器が溶ける可能性が示唆された」との記載がある。そのため、溶媒中の被験物質の安定性を検討する前に、溶けた容器の成分が直接、ATP発光量に影響を与える可能性が懸念された。そこで、溶媒対照群のデータのうちAOOを用いた群

と他の溶媒を用いた群に着目した。なお、DMSO塗布群ではDMSO自体によりATP発光量が上昇するので、AOO塗布群とacetone塗布群を検討した。その結果、同一溶媒を用いた施設間の差の方が、異なる溶媒を同一施設内で用いた際の差より大きいと考えられることから、溶媒の違いによって反応性に大きな差があるとはいえないと考えられた。このことにより、仮に容器の成分が溶けたとしても、容器の成分が直接、ATP発光量に影響を与えるとはいえないと考えられた。しかし、溶けた容器の成分が被験物質の溶解性に影響を与え、試験結果に影響する懸念がある。E (cobalt chloride)は、第1回のバリデーションで全ての施設で析出、沈殿が認められたが、輸送容器をプラスチック容器からガラス容器に変えた第２回目では沈殿は認められなかった。このことは第1実験においては、容器（の溶けた成分)が被験物質の析出、沈殿に影響を与えている可能性を示唆するものと考えられる（第2実験では輸送容器をガラス製にしたためこのような容器による懸念は無いと考えられる）。第２実験では被験物質B、E、M、Nはいずれも調製時の被験物質の状態と投与時の状態は一致していた（LLNA-DA法バリデーション研究（第2実験)報告書表3.2.2.及び3.3.1)。J (nickel sulfate)については調製時に高濃度においてのみ懸濁状態であったが、投与時には全ての濃度で沈殿等の変化が認められ、超音波処理し懸濁液として投与された。N (potassium dichromate)については凝固等の変化が認められたが、溶解させた後に投与された。

被験物質の安定性に関する評価委員会での議論について、ダイセル化学工業（株）より B (hexylcinnamic aldehyde)、C (3-aminophenol)およびK (abietic acid)は調製後22日間にわたり安定であったとの結果が提供された（LLNA 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2007.11.8)。このデータにより、バリデーション試験時には、これら３被験物質が定められた媒体中で安定であるという結果が示された。しかしながら、容器が溶ける可能性を考慮に入れ、同じ容器、同じ保管条件を用いた安定性試験結果ではなかった。実際に第１実験の時に被験物質調製時の物質の状態と投与時の状態とが異なっているという情報がバリデーション研究報告書中に記載されているため、この提供された結果のみをもって、第１実験において調製時と同じ状態の被験物質が試験施設で投与に供されたことの保証にはならないと考えられた。

変質のない被験物質が試験施設に配布され投与に供されることにより、施設間再現性、LLNAとの一致性の検討が可能となるため、この間の安定性に懸念がある場合には慎重に評価を進める必要がある。評価委員会は、すでに終了した実験結果を知った後に、問題のありそうな物質を除くことはバリデーション評価として妥当性に欠くことから、計画した通りの全体で評価することを基本とし、追加検討として物質の安定性に問題がないと推定される物質のみでも施設間再現性を考察し、双方を総合的に勘案して結論をもつこととした。なお、安定性に問題がないと推定される物質としては、調製時の状態と投与時の状態が一致していることを重要視し、第１実験ではA (2,4-dinitrochlorobenzene)、B (hexylcinnamic aldehyde)、D (glutaraldehyde)、F (isoeugenol)、G (formaldehyde)、L (methyl salicylate)、第２実験ではB (hexylcinnamic aldehyde)、E (cobalt chloride)、M (lactic acid)、N (potassium dichromate)とした。被験物質の安定性についてのまとめを表３に示した。

C-3) LLNA-DA法によるSI値の施設内再現性

施設内再現性については、第1実験および第2実験において陽性対照物質である25% hexylcinnamic aldehydeを用いて検討した。その結果、それぞれの報告書の図3.5.2および表3.8.1で示されたように、exp（$\tau^2$）は一番大きかった施設においても1.05であり、ほとんどの施設で最小値の1に近い値であった。

これらの結果から、評価委員会はLLNA-DA法の施設内再現性は良好であると判断した。

C-4) LLNA-DAによるSI値の施設間再現性

12物質を用い、10施設で行われた第1実験では、指標として用いたexp（$\tau^2$）が1.00～4.15の値であったが、飛びぬけて大きな値を示したのはE(cobalt chloride)とJ(nickel sulfate)の高濃度（順に、2.64、4.15）だけであり、E、JおよびD(glutaraldehyde)の中濃度（1.36）を除き、全て1.2以下であった（第1実験報告書：表3.7.1)。なお、exp（$\tau^2$）値とはバリデーションの試験でのSI値から算出したばらつきの指標であり、1.2は施設間差が大きくないと認めうる基準値として、バリデーション研究報告書で提案されている値である。一方、5物質を用い、7施設で行われた第2実験ではE(cobalt chloride)を含め、全てexp（$\tau^2$）が1.2以下であった。第1実験におけるE（cobalt chloride)、J（nickel sulfate)は、いずれも2施設が懸濁液として、1施設が超音波処理により溶解確認後に溶液として投与したと報告されており、投与液の状態の差が施設間のばらつきに影響していると考えられた。

評価委員会において安定性に問題ないと推定した被験物質で同様な検討を行ったところ、第1実験におけるD（glutaraldehyde)の中濃度を除き、第1実験と第2実験の全てにおいてexp（$\tau^2$）が1.2以下であった。

これらの結果から、評価委員会はLLNA-DA法の施設間再現性はおおむね良好であると判断した。

C-5) LLNA-DA法による感作性の有無の評価の施設間再現性

10施設の参加で行われた第1実験において（表4-1)、陽性物質として用いたA (2,4-dinitrochlorobenzene 、10施設)、B（hexylcinnamic aldehyde 、10施設)、F（isoeugenol 、3施設)、およびK（abietic acid 、3施設)はいずれの施設においても陽性と判定された。しかし、同様に陽性物質として用いたD（glutaraldehyde)、E（cobalt chloride)、G（formaldehyde)は3施設中1施設が陰性と判定され、C（3-aminophenol)は3施設とも陰性と判定された。このうち、E（cobalt chloride)とC (3-aminohenol)については析出、沈殿が認められており、実質の濃度の低下が原因となり陰性となった可能性が考えられた。 一方、陰性物質については、H（dimethyl isophthalate、3施設)、I（isopropanol、10施設)、L（methyl salicylate、3施設)はいずれの施設でも陰性と判定されたが、J（nickel sulfate)は3施設中1施設が陽性と判定された。J（nickel sulfate)は、析出物を超音波処理して溶解確認後に投与した施設では陽性を示し、懸濁適用した2施設はそれぞれ陽性、陰性となり、ばらつきが認められていた。同じく溶解状態や懸濁状態が原因となって陽性、陰性を分けた可能性が考えられた。本物質はLLNA法陰性の報告が多いが、LLNA法で陽性とのRyanらの報告（Food Chem. Toxicol 40, 1719-1725, 2002)もある。

一方、7施設の参加で行われた第2実験では（表4-2)、陽性物質であるB（hexylcinnamic aldehyde)、

N (potassium dichromate)は7施設、全てで陽性と判定され、陰性物質であるJ (nickel sulfate)、M (lactic acid)は4施設、全てで陰性と判定された。陽性物質であるE (cobalt chloride)については、4施設の結果が陽性2施設、陰性2施設に分かれた。

評価委員会において安定性に問題ないと推定した被験物質で同様な検討を行ったところ、第1実験においては、陽性物質として用いた被験物質A (2,4-dinitrochlorobenzene 、10施設)、B (hexylcinnamic aldehyde 、10施設)およびF (isoeugenol 、3施設)はいずれの施設においても陽性と判定された。しかし、同様に陽性物質とされているD (glutaraldehyde)、G (formaldehyde)は３施設中1施設において陰性と判定された。陰性と判定した1施設における高濃度のSI値はDが2.57、Gが2.69と3を超えないものの3付近の値であり、いずれも3用量の値に用量反応関係があるので、現実に実験が行われる場合には仮に陰性と判定された場合、より高い用量での再実験が行われると思われることから、この不一致は実際的には大きな問題にならないと考えられた。一方、陰性物質については、I (isopropanol、10施設)、L (methyl salicylate、3施設)はいずれの施設でも陰性と判定された。

第2実験では陽性物質であるE (cobalt chloride)の判定が陽性と陰性、2施設対2施設に分かれた。被験物質Eは、第1実験では塗布操作の影響と考えられる大きなばらつきが認められたが、第2実験では改善され、ばらつきは小さくなった。第2実験で施設間に評価の差が生じたのはSI値が最高濃度の5％でもSI値3を超えないが3付近であるためと考えられる。3用量の値に用量反応関係があるので、現実に実験が行われる場合にはより高い用量での再実験が行われると思われ、実際的には大きな問題にならないと考えられた。

C-6) LLNA-DA法の感度、特異性、予測性、正確性

第１実験の結果を表4-1、第２実験の結果を表4-2にまとめた。また、第１実験の結果を参加施設の結果を被験物質毎に集計し、多数施設での判定をもとに、LLNA-DA法の結果をLLNA法の結果と比較したところ（表4-3)、感度 (sensitivity: 陽性物質を陽性と判定する能力) 87.5％、特異度 (specificity: 陰性物質を陰性と判定する能力) 75.0％、陽性検出力 (positive predictivity: 陽性との結果が得られた物質が陽性である割合) 87.5%、陰性検出力 (negative predictivity: 陰性との結果が得られた物質が陰性である割合) 75.0%、正確性 (accuracy: 判定結果が正確である割合) 83.3%であった。なお、評価委員会において安定性に問題ないと推定した６被験物質 (陽性５物質、陰性１物質) で同様な検討を行ったところ、LLNA法とLLNA-DA法の結果は全て一致した。

第２実験では施設により評価が半数づつ陽性と陰性に分かれたE (cobalt chloride)を除き、４被験物質 (陽性２物質、陰性２物質) を用いて検討したところ、LLNA-DA法の結果とLLNA法の結果は一致した。

評価委員会はLLNA-DA法によるE (cobalt chloride)の結果から考えて金属類の評価においてLLNA-DA法はLLNA法と同等の結果が得られないことがあると考えたが、それ以外の物質においては、ほぼ同等な評価を行えるものと考えた。なお、C (3-aminophenol)については、安定性の問題があり、偽陰性物質と断定することはできなかった。最終的に、バリデーションで用いた14物質の結果と一次評価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-DA法の総合的な代替の可能性について結論できず、LLNA法とLLNA-DA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、合わせて以下に検討した。

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

申請者は31物質についての自家試験結果をまとめて評価委員会に平成19年11月8日に提出した。それによれば、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20物質のうちmercaptobenzothiazolを除く19物質についてLLNA-DA法で陽性であった（感度95.0%）。また、LLNA法で陰性とされた10物質のうちbenzalkonium chlorideを除いた9物質でLLNA-DA法で陰性との結果が得られた（特異性90.0%）。陽性検出力は95.0%、陰性検出力は90.0%、正確性は93.3%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用性試験法（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-DA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。

今回のバリデーションでは新たに加えた3-aminophenolがおそらく安定性が原因となって偽陰性になり、cobalt chlorideにおいて施設間で評価の違いが認められ、その他若干の施設間での違いが認められたが、申請者の結果とほぼ同等の結果が得られた。これらの結果から、評価委員会では、金属類あるいはmercaptobenzothiazolに構造的に近い物質などの中に注意すべき物質があると思われるが、LLNA-DA法は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-DA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-DA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-DA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、皮膚感作性を評価するLLNA法の代替として有用であると判断された。

以上

表１：LLNA バリデーション実行委員および所属施設

| | 氏名 | 所属施設 | 役割 | 担当# |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 大森 崇 | 京都大学大学院医学研究科医療統計学分野 | 委員長 | データ解析 |
| 2 | 小島 肇 | 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 | 委員 | 被験物質供給 |
| 3 | 寒水孝司 | 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター | 委員 | データ解析 |
| 4 | 吉村 功 | 東京理科大学工学部経営工学科 | 委員 | データ解析 |
| 5 | 出原賢治 | ダイセル化学工業（株）評価・解析センター | 委員 | 申請者、実験実施 |
| 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 | 委員 | 実験実施 |
| 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 | 委員 | 実験実施 |
| 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 | 委員 | 実験実施 |
| 9 | 小坂忠司 | （財）残留農薬研究所 毒性部 | 委員 | |
| 10 | 浦谷 衛 | 石原産業（株）中央研究所 安全科学研究室 安全性グループ | 委員 | 実験実施 |
| 11 | 山中 淳 | ピアス（株）中央研究所 ARI 評価グループ | 委員 | 実験実施 |
| 12 | 篠田伸介 | （株）薬物安全性試験センター埼玉研究所 第二毒性部 | 委員 | 実験実施 |
| 13 | 中村洋介 | 住友化学株式会社 情報電子化学業務室 | 委員 | 実験実施 |
| 14 | 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 | 委員 | 実験実施 |
| 15 | 米田知史 | トーアエイヨー（株）研究開発部 福島研究所 | 委員 | 実験実施 |
| 16 | 花田智彦 | 日本新薬（株）創薬研究所 安全性研究部 | 委員 | 実験実施 |
| 17 | 猪田健人 | 中野製薬（株）マーケティング本部研究 | 委員 | |
| 18 | 田中正志 | 明治製菓（株）医薬開発部門 動態安全性研究所 | 委員 | 実験実施 |
| 19 | 有馬和範 | 大正製薬（株）安全性研究所 | 委員 | 実験実施 |
| 20 | 宇佐美雅仁 | ホーユー（株）総合研究所 基盤技術研究室 | 委員 | 実験実施 |
| 21 | 篠田直樹 | 参天製薬（株）奈良研究開発センター | 委員 | 実験実施 |
| 22 | 湯浅敦子 | 富士フイルム（株） CSR 推進部 環境・品質マネジメント部素材試験センター | 委員 | 実験実施 |
| 23 | 牧 栄二 | （財）食品農医薬品安全性評価センター | 委員 | 実験実施 |

#:委員会でのバリデーション実施に関する審議以外に特に担当した分野

表２：バリデーションで用いられた被験物質

| 被験物質コード | 物質名 | 感作性の有無と程度* | 第１実験 | 第２実験 |
|---|---|---|---|---|
| A | 2,4-dinitrochlorobenzene | 非常に強い | ○ | |
| B | hexylcinnamic aldehyde | 中程度 | ○ | ○ |
| C | 3-aminophenol | 中程度 | ○ | |
| D | glutaraldehyde | 非常に強い | ○ | |
| E | cobalt chloride | 強い | ○ | ○ |
| F | isoeugenol | 中程度 | ○ | |
| G | formaldehyde | 強い | ○ | |
| H | dimethyl isophthalate | 無し | ○ | |
| I | isopropanol | 無し | ○ | |
| J | nickel sulfate | 無し** | ○ | ○ |
| K | abietic acid | 弱い | ○ | |
| L | methyl salicylate | 無し | ○ | |
| M | lactic acid | 無し | | ○ |
| N | potassium dichromate | 強い | | ○ |

*: LLNA 法での評価結果に基づく判定

**: ヒトでは陽性と報告されている。

表3　被験物質の安定性についてのまとめ

| | 被験物質 | 媒体[1] | 容器 | 調製時(配布前)の状態 | 投与時の状態 | 調製時の状態と投与時の状態の一致 | 22日間の安定性試験データ[2, 3] | 安定性に問題がないと推定し、別途解析する被験物質 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 第1実験 | A:2,4-dinitrochlorobenzene | AOO | ﾌﾟﾗｽﾁｯｸ製 | 溶解 | 溶解 | 一致 | NT | ○ |
| | B: hexylcinnamic aldehyde | AOO | ﾌﾟﾗｽﾁｯｸ製 | 溶解 | 溶解 | 一致 | 安定 | ○ |
| | C: 3-aminophenol | AOO | ﾌﾟﾗｽﾁｯｸ製 | 溶解 | 懸濁 | 不一致 | 安定 | |
| | D: glutaraldehyde | ACE | ﾌﾟﾗｽﾁｯｸ製 | 溶解 | 溶解 | 一致 | NT | ○ |
| | E: cobalt chloride | DMSO | ﾌﾟﾗｽﾁｯｸ製 | 溶解 | 2施設が懸濁、1施設が溶解 | 不一致 | NT | |
| | F: isoeugenol | AOO | ﾌﾟﾗｽﾁｯｸ製 | 溶解 | 溶解 | 一致 | NT | ○ |
| | G: formaldehyde | ACE | ﾌﾟﾗｽﾁｯｸ製 | 溶解 | 溶解 | 一致 | NT | ○ |
| | H: dimethyl isophthalate | AOO | ﾌﾟﾗｽﾁｯｸ製 | 溶解 | 施設により差あり | 不一致 | NT | |
| | I: isopropanol | AOO | ﾌﾟﾗｽﾁｯｸ製 | 溶解 | 施設により差あり | 不一致 | NT | |
| | J: nickel sulfate | DMSO | ﾌﾟﾗｽﾁｯｸ製 | 高濃度で懸濁 | 2施設が懸濁、1施設が溶解 | 不一致 | NT | |
| | K: abietic acid | AOO | ﾌﾟﾗｽﾁｯｸ製 | 溶解、ただし3回中1回の調製において高濃度で懸濁 | 懸濁 | 不一致 | 安定 | |
| | L: methyl salicylate | AOO | ﾌﾟﾗｽﾁｯｸ製 | 溶解 | 溶解 | 一致 | NT | ○ |
| 第2実験 | B: hexylcinnamic aldehyde | AOO | ｶﾞﾗｽ製 | 溶解 | 溶解 | 一致 | 安定 | ○ |
| | E: cobalt chloride | DMSO | ｶﾞﾗｽ製 | 溶解 | 溶解 | 一致 | NT | ○ |
| | J: nickel sulfate | DMSO | ｶﾞﾗｽ製 | 高濃度で懸濁 | 全濃度で懸濁 | 一致 | NT | |
| | M: lactic acid | DMSO | ｶﾞﾗｽ製 | 溶解 | 溶解 | 一致 | NT | ○ |
| | N: potassium dichromate | DMSO | ｶﾞﾗｽ製 | 溶解 | 溶解 | 一致 | NT | ○ |

1) AOO : acetone/olive oil, ACE:acetone, DMSO:dimethyl sulfoxide

2) NT: not tested

3) 本安定性データはバリデーション後に実施され、バリデーションと同一の容器、同一の保管条件の結果ではない

表 4-1　各施設での個々の物質の判定結果（第 1 実験）

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

*:LLNA法の評価結果に基づく感作性の判定

表 4-2　各施設での個々の物質の判定結果（第 2 実験）

| 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

表 4-3　代替可能性の指標（第 1 実験の結果＊）

| | 被験物質数 | 感度 | 特異度 | 陽性予測度 | 陰性予測度 | 正確性 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LLNA-DA 法 vs LLNA 法 | 12 | 87.5% (7/8) | 75.0% (3/4) | 87.5% (7/8) | 75.0% (3/4) | 83.3% (10/12) |

＊：ここの被験物質について、施設毎の感作性評価について多数施設での判定結果をもとに計算

表5-1：LLNA-DA 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）

| chemicals | 判定結果 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | LLNA-DA | LLNA* | GMPT/BA* | HMT/HPTA* |
| 2,4-dinitrochlorobenzene | + | + | − | ND |
| *p*-phenylenediamine | + | + | − | + |
| toluene 2,4-diisocyanate | + | + | ND | ND |
| glutaraldehyde | + | + | + | + |
| Potassium dichromate | + | + | + | + |
| phthalic anhydride | + | + | + | ND |
| trimellitic anhydride | + | + | ND | ND |
| formaldehyde | + | + | + | + |
| cinnamic aldehyde | + | + | + | + |
| isoeugenol | + | + | + | + |
| Cobalt chloride | + | + | + | + |
| eugenol | + | + | + | + |
| resorcinol | + | + | + | + |
| benzocaine | + | +/− | + | + |
| abietic acid | + | + | + | + |
| hexyl cinnamic aldehyde | + | + | + | ND |
| mercaptobenzethiazol | − | + | + | + |
| citral | + | + | + | + |
| hydroxycitronellal | + | + | + | + |
| imidazolidinyl urea | + | + | + | + |
| Sodium lauryl sulfate | + | + | − | − |
| $NiSO_4$ | − | − | + | + |
| benzalkonium chloride | + | − | − | + |
| propyl paraben | − | − | − | +/− |
| diethylphthalate | − | − | ND | ND |
| 1-bromobutane | − | − | ND | ND |
| methylsalicylate | − | − | − | − |
| chlorobenzene | − | − | − | ND |
| lactic acid | − | − | − | ND |
| hexane | − | − | ND | − |
| isopropanol | − | − | − | ND |

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

GMPT: Guinea pig maximization test, BA: Buehler assay

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

表5-2：LLNA-DA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-DA試験結果 | ＋ | 2,4-dinitrochlorobenzene, p-phenylenediamine, toluene 2,4-diisocyanate, glutaraldehyde, K2Cr2O7, phthalic anhydride, trimellitic anhydride, formaldehyde, cinnamic aldehyde, isoeugenol, CoCl2, eugenol, resorcinol, abietic acid, hexylcinnamic aldehyde, citral, hydroxycitronellal, imidazolidinyl urea, Sodium lauryl sulfate | benzalkonium chloride |
| | － | mercaptobenzethiazol | NiSO4, propyl paraben, diethylphthalate, 1-bromobutane, methylsalicylate, chlorobenzene, lactic acid, hexane, isopropanol |

＋：感作性試験結果が陽性、－：感作性試験結果が陰性

| | 被験物質数* | 感度 | 特異度 | 陽性予測度 | 陰性予測度 | 正確性 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LLNA-DA法 vs LLNA法 | 30 | 95.0% (19/20) | 90.0% (9/10) | 95.0% (19/20) | 90.0% (9/10) | 93.3% (28/30) |

＊：LLNA-DAで＋、LLNAで+/-となったbenzocaineは計算に入れていない。

追加資料（080828）

表 4-3　代替可能性の指標（第１実験の結果＊）

| | 被験物質数 | 感度 | 特異度 | 陽性予測度 | 陰性予測度 | 正確性 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LLNA-DA 法 vs LLNA 法 | 12 | 87.5% (7/8) | 75.0% (3/4) | 87.5% (7/8) | 75.0% (3/4) | 83.3% (10/12) |

＊：個々の被験物質について、施設毎の感作性評価について多数施設での判定結果をもとに計算

表 4-3 改変１　代替可能性の指標（第１実験の結果＊）

| | 被験物質数 | 感度 | 特異度 | 陽性予測度 | 陰性予測度 | 正確性 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LLNA-DA 法 vs LLNA 法 | 12 | 87.5% (7/8) | 75.0% (3/4) | 87.5% (7/8) | 75.0% (3/4) | 83.3% (10/12) |

＊：個々の被験物質について、重み付平均値での判定結果をもとに計算

表 4-3 改変２　代替可能性の指標（第１実験の結果＊）

| | データ数 | 感度 | 特異度 | 陽性予測度 | 陰性予測度 | 正確性 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LLNA-DA 法 vs LLNA 法 | 57 | 84.2% (32/38) | 89.5% (17/19) | 94.1% (32/34) | 73.9% (17/23) | 86.0% (49/57) |

＊：個々の被験物質について、施設毎の判定結果をもとに計算

施設毎に評価が分かれた物質

| 被験物質 | 陽性数 | 陰性数 | 多数決 | 重み付け | vivo |
|---|---|---|---|---|---|
| 3-アミノフェノール | 0 | 3 | − | − | + |
| グルタルアルデヒド | 2 | 1 | + | + | + |
| フォルムアルデヒド | 2 | 1 | + | + | + |
| 塩化コバルト（第１実験） | 2 | 1 | + | + | + |
| （第２実験） | 2 | 2 | +/− | + | + |
| 硫酸ニッケル(第１実験) | 2 | 1 | + | + | − |
| （第２実験） | 0 | 4 | − | − | − |

表 4-3 改変３　代替可能性の指標（第１＆２実験の結果*）

| | 被験物質数 | 感度 | 特異度 | 陽性予測度 | 陰性予測度 | 正確性 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LLNA-DA 法 vs LLNA 法 | 14 | 88.9% (8/9) | 100.0% (5/5) | 100.0% (8/8) | 83.3% (5/6) | 92.9% (13/14) |

＊：個々の被験物質について、重み付平均値での判定結果をもとに計算
塩化コバルトおよび硫酸ニッケルは第２実験の結果を使用

# LLNA-DA 法バリデーション研究

## 報告書（概括）

Version 1.0

報告書作成日：2007 年 5 月 18 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（ホーユー株式会社　総合研究所　基盤技術研究室）
篠田直樹（参天製薬株式会社奈良研究開発センター）
湯浅敦子（富士フイルム株式会社　CSR 推進部　環境・品質マネジメント部
素材試験センター）
牧　栄二（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）

目次

## 1　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の報告書である．

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法を新しい皮膚感作性試験の代替法として応募した．研究班ではこの方法がRIを用いないという利点以外にも簡便で，かつ時間のかからない方法であり，評価するに値する方法であると判断し，日本動物実験代替法学会評価委員会に評価を依頼した．その結果，LLNA-DA法には複数の施設で実施されたバリデーション研究が必要とされ，日本動物実験代替法学会バリデーション委員会の支援により，バリデーション研究を実施することとなった．これが本報告書で報告するバリデーション研究である．

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施設が第1グループとして，先行する研究の実施施設となった．本研究では，第1グループにより実施された研究を第1実験と呼ぶことにする．この研究の結果は「LLNA-DA法バリデーション研究（第1実験）報告書」としてまとめた．残りの9施設については第2グループとして，第1実験の結果が得られた後に第1実験で生じた課題を評価することとした．第2グループの実験は施設による実験期間の都合により実際に実験を実施した施設は7施設となった．第2グループにより実施された研究をここでは第2実験と呼ぶことにする．この研究の結果は「LLNA-DA法バリデーション研究（第2実験）報告書」としてまとめた．

本概括では，2つのバリデーション研究の要約，2つのバリデーション研究の評価外のLLNA-DA法の特徴および総合的な結論を記載することにする．

## 2　２つの研究の要約

第１実験，第２実験それぞれの研究の詳細は，別に記載する報告書を参照されたい．ここでは，個々の研究の要約を示す．

### 2.1　第１実験の要約

**【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である Guinea-Pig Maximization Test や Buehler Test（GPMT/BT 法）の代替法として広く知られている． LLNA-DA 法は $^{3}$H-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.第 1 実験では，施設間再現性と代替可能性の検討を主目的とした LLNA-DA 法の多施設バリデーション研究を実施した.

**【方法】**実験は, このバリデーション研究用に作成された LLNA-DA 法の standard operating procedure (SOP)に従って実施した．実験を行う前に，提案施設が主導となり技術研修会を実施した．12 被験物質のうち，3 物質は全 10 施設で，残りの 9 物質は 3 施設ごとに評価した．各被験物質をコード化し，3 用量に調製して各実験施設に送付した．判定基準は溶媒対照群の ATP 発光量に対する被験物質群の ATP 発光量の比(stimulation index, SI 値)が 3 を超えた場合に陽性と判定した.

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

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

## 2.2　第 2 実験の要約

**【目的】**LLNA 法やそれに類した方法を実施した経験がある 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（第 1 実験）では，Acetone/Olive Oil（AOO）と Aceton （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 dimethyl sulfoxcide（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不明であった．そこで第 2 実験では，1)試験法の実施のしやすさの判定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 DMSO を用いる被験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，第 1 実験と同様にこのバリデーション研究用に作成された SOP に従って実施した．実験を行う前に，提案施設が主導となり技術研修会を実施した．その際，DMSO の塗布が新たに項目として追加された．5 被験物質のうち，1 物質は第 1 実験と共通の被験物質とし，全 7 施設で実験を実施し，残りの 4 物質は 4 施設ごとに評価した．この 4 物質は溶媒に DMSO を用いるものが選ばれ，そのうち 3 物質が金属塩であった．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、第 1 実験と同様に 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 施設すべてが「一定の基準を満たす施設」であると判定された．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 を用いる場合は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．

## 3. 2つの研究の評価外のLLNA-DA法の特徴

### 3.1 試験法の頑健性

本研究では，可能な限り条件をそろえて試験法の評価を試みた．このため動物種やATP発光量の測定器の違いを含めて研究で作成したSOPとの違いがどの程度結果に影響するのかは明確ではない．

### 3.2 動物福祉面について

動物の福祉に関する側面に関して，LLNA-DA法はLLNA法と基本的には変わりはない．すなわち，この試験系はマウスを使った*in vivo*の試験法であり動物を使用しない方法ではない．しかしながら，皮膚感作性評価に関して，従来より実施されてきたモルモットの実験と比べて，これらの方法では要求される動物の使用数を減らすことができるという点では利点がある．また，LLNA-DA法は7日目に塗布操作が入るため実験に要する日数は8日とLLNA法と比べて2，3日が長くなるものの，これらの方法は感作誘導反応を評価しているため，感作誘発期の評価を行うGPMT法（24日程度）やBT法（38日程度）に比べて，実験に要する日数が短いという利点がある．また，GPMT法ではモルモットの感受性を高めるためにAdjuvantを用いるが，これは動物に対する負担が大きい．一方，LLNA-DA法やLLNA法ではAdjuvantを用いないので，Refinementの観点から優れているといえるであろう．

### 3.3 コストについて

LLNA法はRadioactive Isotope （RI）施設で実施する必要があり，$^{3}$Hで標識されたチミジンのDNAへの取り込み量を測定するためにシンチレーションカウンターが必要である．これに対して，LLNA-DA法はRI施設で実施する必要がなく，ATP発光量の測定器はシンチレーションカウンターに比べて相対的に安価である．

また，試薬の観点でも，LLNA-DA法で用いるATP発光量の測定キットは比較的安価であり，測定も容易である．

### 3.4 SOPとプロトコールに関して

本研究で用いたSOPは，当初の提案施設が作成したLLNA-DA法プロトコールを基に，バリデーション研究用に作成されたものである．本研究のSOPでは，バリデーション研究用に設定された群の構成等に関する事項だけでなく，LLNA-DA法の操作で重要な点である「細胞懸濁液の調製の実験手順」及び「ATP量の測定」に関しても補遺として加筆した．提案施設の作成したLLNA-DA法

プロトコールを今後改訂する際には，本研究で使用されたSOPの内容を反映させるべきであろう．

### 3.5 評価委員による評価結果への返答としてのまとめ

本研究を実施する前に，バリデーション研究の実施に関して日本動物実験代替法学会評価委員会より，以下の助言を受けた．1)中心となる施設には提案施設のダイセル化学工業（株）が務め，SOP を作成し，技術移転を実施する．2)実験実施施設には ATP 発光量の測定器を有することが望ましい．3)実験施設は 1 施設あたり最大 6 被験物質程度が実施可能であろう．4)1 群あたりの動物数は 4 匹がよい．5)濃度設定は公比 10 の 3 濃度で行うのがよい．6)被験物質の候補リストは提案施設の協力を得て作成する．7)バイアスがなるべく少なくなるように，条件をそろえて実施するのが良い．

これらの助言に関して，本研究では 5)の公比 10 での濃度設定をという点が守られていない．5)は施設で被験物質を希釈する際に施設によって公比が異なることがないように統一するという意味であると思われる．本研究では被験物質を配布する際に希釈して送付しているため，施設によって異なる濃度で被験物質を実験することはない．本研究での濃度設定は，過去に提案施設にて実施された実験の SI 値もしくは LLNA 法の文献値に基づき設定された．

## 4．総括

LLNA-DA 法は，GPMT/BT 法に比べて動物数の削減，苦痛の低減，定量的な評価が可能という点で優れており，LLNA 法に比べて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利点がある．

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 14 物質を用いて，全 17 施設の実験実施施設による 2 つのバリデーション研究を実施した結果，LLNA-DA 法は実施しやすい試験法であり，施設間差が小さく，GPMT/BT 法に対する代替可能性は LLNA 法とほぼ同等である試験法であることが確認された．

以上より，LLNA-DA 法は皮膚感作性を評価する試験法として有用である．

添付資料３

# LLNA－DA 法バリデーション研究報告書

# LLNA-DA 法バリデーション研究（第 1 実験）

# 報告書

Version 2.1

報告書作成日：2007 年 6 月 27 日

報告書作成責任者：　大森　崇

## LLNA-DA 法バリデーション研究実行委員

委員長
大森　崇（京都大学大学院医学研究科医療統計学分野）

委員
小島　肇（国立医薬品食品衛生研究所薬理部）
寒水孝司（大阪大学臨床医工学融合研究教育センター）
吉村　功（東京理科大学工学部経営工学科）
出原賢治（ダイセル化学工業株式会社　評価・解析センター）
五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所　環境衛生化学部）
金澤由基子（財団法人食品薬品安全センター秦野研究所　医療用具試験室）
武吉正博（財団法人　化学物質評価研究機構安全性　評価技術研究所
研究第一部）
小坂忠司（財団法人　残留農薬研究所　毒性部）
浦谷　衛（石原産業株式会社　中央研究所　安全科学研究室　安全性グループ）
山中　淳（ピアス株式会社　中央研究所　ARI 評価グループ）
篠田伸介（株式会社　薬物安全性試験センター埼玉研究所　第二毒性部）
中村洋介（住友化学株式会社　情報電子化学業務室）
青儀　巧（大塚製薬株式会社　徳島研究所　安全性研究センター　第２研究室）
米田知史（トーアエイヨー株式会社　研究開発部　福島研究所）
花田智彦（日本新薬株式会社　創薬研究所　安全性研究部）
猪田健人（中野製薬株式会社　マーケティング本部研究）
田中正志（明治製菓株式会社　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（ホーユー株式会社　総合研究所　基盤技術研究室）
篠田直樹（参天製薬株式会社奈良研究開発センター）
湯浅敦子（富士フイルム株式会社　CSR 推進部　環境・品質マネジメント部
素材試験センター）
牧　栄二（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）

略号の原語または意味

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

目次

## はじめに

本報告書は，日本動物実験代替法学会バリデーション委員会により組織されたLLNA-DA法バリデーション研究実行委員会が実施したバリデーション研究(第1実験)の報告書の第2版である．

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

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

要約

【目的】local lymph node assay（LLNA 法）はマウスのリンパ節細胞増殖反応により皮膚感作性を評価する試験法であり，モルモットを用いた試験法（GPMT/BT 法）の代替法として広く知られている． LLNA-DA 法は$^{3}$H-thymidine の取り込み量の代わりに ATP 量を指標として判定する方法であり，ラジオアイソトープの管理に厳しい本邦でも容易に実施できるという利点がある.本研究では，施設間再現性と代替可能性の検討を主目的とした LLNA-DA 法の多施設バリデーション研究を実施した.

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

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

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

# 1．背景

## 1.1　皮膚感作性

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

動物を用いた皮膚感作性試験では，長い間モルモットを用いた試験である Guinea-pig maximization test 法（GPMT 法）や Buehler test 法（BT 法）により実施されてきた（OECD（1992））．これらの試験法では，感作誘導を行い，一定期間後の惹起処置による皮膚反応を観察することによって感作性を評価する．評価方法は，肉眼判定によるため主観が入る可能性があると言われている．GPMT 法では，感度を高めるために通常 Freund's Complete Adjuvant（FCA）を被験物質と乳化して皮内投与することにより感作誘導を行うが，BT 法では FCA を用いない．

## 1.3　LLNA 法

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

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

LLNA 法は感作誘導期のリンパ節細胞増殖反応を $^{3}$H で標識されたチミジン（$^{3}$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，我が国では RI（Radioactive Isotope）の取り扱い規制が厳しく，LLNA

法の普及は十分ではない.

### 1.4 LLNA-DA 法

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

### 1.5 本研究にいたるまでの過程

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

なお，研究遂行においては，大野泰雄が主任研究者を務める厚生労働科学研究「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」班の協力を得た.

### 1.6 本研究の目的

本研究の目的は，LLNA-DA 法を被験物質名遮蔽下で実施したときに，

1）複数の施設間でどの程度一致するか（施設間再現性），

2）過去に LLNA 法で得られた判定結果とどの程度一致するか（代替可能性）

を，多施設での実験を通して評価することである.

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

## 2．方法

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

### 2.1　組織と役割

**・研究の組織**

本研究を遂行するための研究組織，LLNA-DA 法バリデーション研究実行委員会（以下，LLNA-DA バリ実行委）は次の委員で構成された．

1）実験施設代表者

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

2）バリデーション委員会委員

日本動物実験代替法学会バリデーション委員会に属する数名．

3）各実験実施施設の代表者として必要な委員

各実験実施施設から数名．

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

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

**・各組織の役割**

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

**実行委員長**：研究組織と運営・進行を計画通りに行い，最終報告を作成する．

**技術研修担当者**：技術研修の準備を行い，LLNA-DA 法の内容，standard

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

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

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

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

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

**実験参加施設代表者**：本実行委に所属し，実験参加施設を代表する．

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

**実験責任者**：施設で実施された実験について責任を持つ．

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

### 2.2 LLNA-DA の操作方法

資料 4「LLNA-DA 法プロトコール」にもとづいて，この研究用に LLNA-DA バリ実行委が SOP を作成した．この SOP の最終版は資料 5「LLNA-DA 法実験 SOP（Version 2.0)」に示すが，本研究での実験手順の概略を以下に示す．

使用動物：雌の CBA/JNCrlj マウス（8 週齢にて入荷）

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

群あたり動物数：1 群あたり 4 匹

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

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

試験操作： LLNA-DA 法では 3 日間連続で 1% sodium lauryl sulfate（SLS）処置 1 時間後に被験物質溶液あるいは懸濁液を 25μL 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．この懸濁液を撹拌し，膜組織を避けて 20μL サンプリングし，

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

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

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

### 2.3 技術研修会

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

さらに，確認用の映像資料も配布した．

### 2.4 ルミノメータの校正

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

### 2.5 予備実験

作成された SOP で十分な実験が行えるかどうかを確認するために，別添 3「LLNA-DA 法標準作業手順（予備試験用）Version 1.5」に従い陽性対照のみを用いた予備実験を実施した．LLNA-DA 実行委は，予備実験の結果をもとに，SOP にしたがって実験を実施することができたか，陽性対照が陽性対照として機能しているか，施設間差がどの程度あるかを検討した．その結果，すべての施設で陽性対照物質は陽性と判断され，提案施設の背景データのばらつきと比べて極端に大きな施設感差が生じていなかったため，本実験を実施することに決めた．特に大きな問題が生じていなかったため，SOP に関して大きな変更は行わなかった．

## 2.6 被験物質

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

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

## 2.7 割付

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

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

表 2.7　被験物質の割付方針の概念図

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

## 2.8　試料等の配布

試料等手配担当者は，各被験物質の試料溶液を調製し，実験参加施設に配布した．

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

## 2.9　実験実施のスケジュール

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

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

本実験は，2006 年 4 月 3 日～7 月 5 日の間に実施した．

別添 4「実験実施期間プラン」に動物入荷と実験実施のスケジュールを示す．

## 2.10　データの管理

### 記録用紙

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

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

の項目からなる．

### データシート

データ解析担当者は，データ解析のために，個々の動物より得られる測定結果（体重，リンパ節重量，ATP 測定量）を入力するデータシート（別添 6「データシート」）を作成した．各実験施設には被験物質のコードが記載されたデータシートファイルが各実験担当者に送付され，実験担当者は実験の測定結果をこのデータシートファイルに入力した．データ解析はここに入力されたデータに基づいて実施されている．

### データクリーニング

データ解析担当者は，収集したデータシートに必要となるデータが入力され

ていなかったり，入力された値やコメントに疑義が生じた場合には，該当施設の実験担当者に連絡をとり内容を確認し，必要に応じて適切な値を入力したデータファイルの再提出を求めた．

## 2.11 データベース

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

## 2.12 データ解析の方法

### *2.12.1 体重，リンパ節重量，ATP 発光量*

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

### *2.12.2 SI 値とその 95%信頼区間の算出*

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

### *2.12.3 施設内再現性、施設間再現性を評価する方法*

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

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

### 2.12.4　代替可能性の検討の方法

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

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

### 2.12.5　EC3 の算出方法と刺激のカテゴリー

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

表 2.1　EC3 と感作性のカテゴリー

| EC3 (%) | 感作性のカテゴリー |
|---|---|
| 算出不可能 | negative |
| ≧10-≦100 | weak |
| ≧1－＜10 | moderate |
| ≧0.1－＜1 | strong |
| ＜0.1 | extreme |

### 2.12.6　ソフトウエア

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

## 3. 結果

### 3.1 研究の質について

研究の質を確保するために，以下のことを実施した．

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

### 3.2 選択された被験物質と割付け結果

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

表 3.2.1　被験物質の割付

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

*:LLNA法の評価結果に基づく感作性の判定

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

表 3.2.2　被験物質の調製日と送付時の物質の状態および被験物質の投与日

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

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

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

### 3.3　データの取り扱いについて

**析出，沈殿等について**

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

**溶媒の誤送付について**

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

**被験物質 E（cobalt chloride）の取り扱い**

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

**入力時の被験物質コードの改変**

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

**データクリーニングの結果**

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

表 3.3.1　被験物質の状態と取り扱い

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

## 3.4 背景基礎データ

### *3.4.1 体重*

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

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

表3.4.1 実験開始1日目の動物の体重(g)の基本統計量

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

表3.4.2 実験開始8日目の動物の体重(g)の基本統計量

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

### 3.4.2 ATP 発光量

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

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

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

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

| | | 施設 | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | | | 2 | | | 3 | | | 4 | | | 5 | | |
| 被験物質 | 濃度 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 |
| A | AOO | 4 | 27188 | 10027 | 4 | 26159 | 2157 | 4 | 35610 | 7212 | 4 | 42866 | 9956 | 4 | 11899 | 7366 |
| | 0.03% | 4 | 77305 | 25181 | 4 | 60843 | 19746 | 4 | 80548 | 34265 | 4 | 127990 | 23651 | 4 | 18107 | 3203 |
| | 0.10% | 4 | 147161 | 32102 | 4 | 70451 | 26337 | 4 | 150579 | 23446 | 4 | 210206 | 57119 | 4 | 45691 | 21305 |
| | 0.30% | 4 | 325485 | 46981 | 4 | 241465 | 73709 | 4 | 354678 | 27371 | 4 | 365768 | 51573 | 4 | 166224 | 43333 |

| | | 施設 | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 6 | | | 7 | | | 8 | | | 9 | | | 10 | | |
| 被験物質 | 濃度 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 |
| A | AOO | 4 | 13910 | 3921 | 4 | 22466 | 3515 | 4 | 20576 | 5546 | 4 | 26842 | 9515 | 4 | 53350 | 14893 |
| | 0.03% | 4 | 38247 | 10833 | 4 | 86083 | 21219 | 4 | 49730 | 22738 | 4 | 75290 | 20086 | 4 | 62000 | 23941 |
| | 0.10% | 4 | 59302 | 19598 | 4 | 121021 | 23461 | 4 | 62571 | 30199 | 4 | 112282 | 36388 | 4 | 112163 | 22420 |
| | 0.30% | 4 | 210636 | 46213 | 4 | 296024 | 33270 | 4 | 259203 | 105308 | 4 | 292230 | 5423 | 4 | 251172 | 40569 |

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

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

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

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

| | | 施設 | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | | | 3 | | | 8 | | |
| 被験物質 | 濃度 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 |
| C | AOO | 4 | 27188 | 10027 | 4 | 24047 | 3932 | 4 | 20576 | 5546 |
| | 1% | 4 | 47591 | 2668 | 4 | 33875 | 4945 | 4 | 25167 | 4299 |
| | 3% | 4 | 63021 | 9400 | 4 | 42352 | 11487 | 4 | 40921 | 10896 |
| | 10% | 4 | 76927 | 15323 | 4 | 41759 | 8243 | 4 | 49037 | 8244 |

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

| | | 施設 | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | | | 2 | | | 5 | | |
| 被験物質 | 濃度 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 |
| D | ACE | 4 | 17947 | 4929 | 4 | 38044 | 13217 | 4 | 16439 | 6488 |
| | 0.05% | 4 | 25594 | 9403 | 4 | 28096 | 9168 | 4 | 17024 | 5163 |
| | 0.15% | 4 | 72748 | 20584 | 4 | 48980 | 8745 | 4 | 40319 | 17078 |
| | 0.50% | 4 | 89767 | 21798 | 4 | 129110 | 31985 | 4 | 42237 | 6048 |

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

| | | 施設 | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 4 | | | 6 | | | 8 | | |
| 被験物質 | 濃度 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 |
| E | DMSO | 4 | 100396 | 24632 | 4 | 4184 | 2395 | 4 | 19803 | 4451 |
| | 0.30% | - | - | - | 4 | 44002 | 30922 | 4 | 87562 | 13336 |
| | 1.00% | 4 | 203895 | 24479 | 4 | 44465 | 23293 | 4 | 131004 | 34534 |
| | 3.00% | 4 | 267172 | 52088 | 4 | 85978 | 24933 | 4 | 159808 | 13473 |

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

| | | 施設 | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 4 | | | 5 | | | 9 | | |
| 被験物質 | 濃度 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 |
| F | AOO | 4 | 42866 | 9956 | 4 | 11899 | 7366 | 4 | 26842 | 9515 |
| | 1% | 4 | 125838 | 22236 | 4 | 22896 | 7449 | 4 | 69256 | 20292 |
| | 3% | 4 | 175277 | 10289 | 4 | 23619 | 8830 | 4 | 86598 | 20489 |
| | 10% | 4 | 262118 | 34406 | 4 | 117098 | 5209 | 4 | 190392 | 38486 |

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

| | | 施設 | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | | | 2 | | | 5 | | |
| 被験物質 | 濃度 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 |
| G | ACE | 4 | 17947 | 4929 | 4 | 38044 | 13217 | 4 | 16439 | 6488 |
| | 0.5% | 4 | 52214 | 10965 | 4 | 64467 | 11056 | 4 | 19510 | 5239 |
| | 1.5% | 4 | 51405 | 13007 | 4 | 115143 | 20638 | 4 | 30959 | 12804 |
| | 5.0% | 4 | 86934 | 33682 | 4 | 120966 | 21688 | 4 | 44219 | 7822 |

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

| | | 施設 | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | | | 3 | | | 7 | | |
| 被験物質 | 濃度 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 |
| H | AOO | 4 | 27188 | 10027 | 4 | 35610 | 7212 | 4 | 22466 | 3515 |
| | 5% | 4 | 36534 | 10199 | 4 | 35710 | 8126 | 4 | 28306 | 4047 |
| | 10% | 4 | 31200 | 10875 | 4 | 34357 | 8364 | 4 | 25555 | 3074 |
| | 25% | 4 | 30030 | 10456 | 4 | 23900 | 3733 | 4 | 23583 | 3751 |

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

| | | 施設 | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | | | 2 | | | 3 | | | 4 | | | 5 | | |
| 被験物質 | 濃度 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 |
| I | AOO | 4 | 24583 | 5761 | 4 | 41189 | 17452 | 4 | 35652 | 12253 | 4 | 43007 | 8931 | 4 | 19146 | 6582 |
| | 10% | 4 | 37756 | 12448 | 4 | 37286 | 9163 | 4 | 36155 | 7444 | 4 | 67307 | 12946 | 4 | 10106 | 3170 |
| | 25% | 4 | 27101 | 2623 | 4 | 35024 | 4878 | 4 | 23465 | 7953 | 4 | 38859 | 7172 | 4 | 14531 | 1549 |
| | 50% | 4 | 28723 | 3313 | 4 | 33259 | 7651 | 4 | 30822 | 4465 | 4 | 34382 | 6421 | 4 | 13581 | 3696 |

| | | 施設 | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 6 | | | 7 | | | 8 | | | 9 | | | 10 | | |
| 被験物質 | 濃度 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 |
| I | AOO | 4 | 16375 | 3953 | 4 | 29925 | 6142 | 4 | 12207 | 4127 | 4 | 29602 | 8049 | 4 | 29077 | 2876 |
| | 10% | 4 | 32233 | 26281 | 4 | 43446 | 17986 | 4 | 14797 | 2984 | 4 | 18791 | 7645 | 4 | 26480 | 4594 |
| | 25% | 4 | 14762 | 5342 | 4 | 27285 | 10469 | 4 | 12387 | 3421 | 4 | 20627 | 6175 | 4 | 30676 | 5707 |
| | 50% | 4 | 21360 | 4957 | 4 | 24776 | 3613 | 4 | 13551 | 1001 | 4 | 15039 | 3697 | 4 | 36216 | 4960 |

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 3.4.3　リンパ節重量と ATP 発光量の関係

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

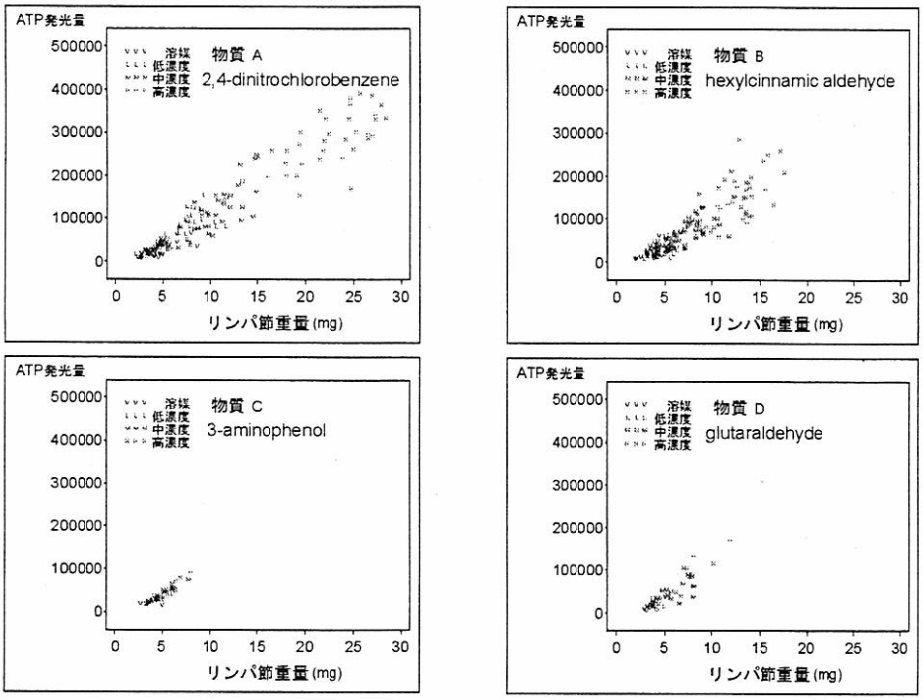



図 3.4.1　リンパ節重量と ATP 発光量の関係

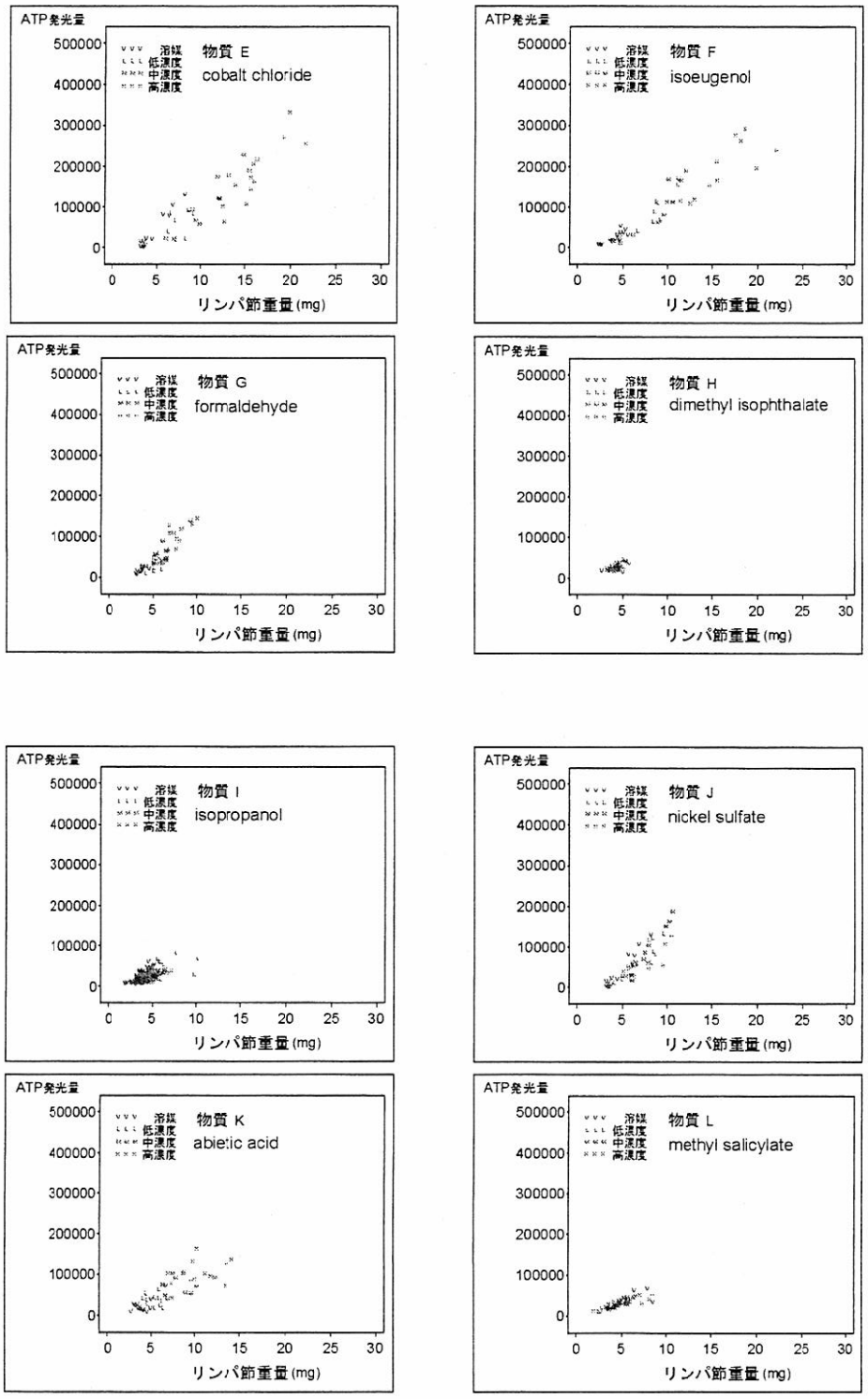



図 3.4.1　リンパ節重量と ATP 発光量の関係（つづき）

### 3.5 LLNA-DA の分析感度

本報告書では，分析感度を陽性対照物質が適切に陽性と判定される能力と定義した．図 3.5.1，図 3.5.2 にそれぞれ予備実験，本実験における各実験の陽性対照物質の SI 値とその 95%信頼区間を示す．

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

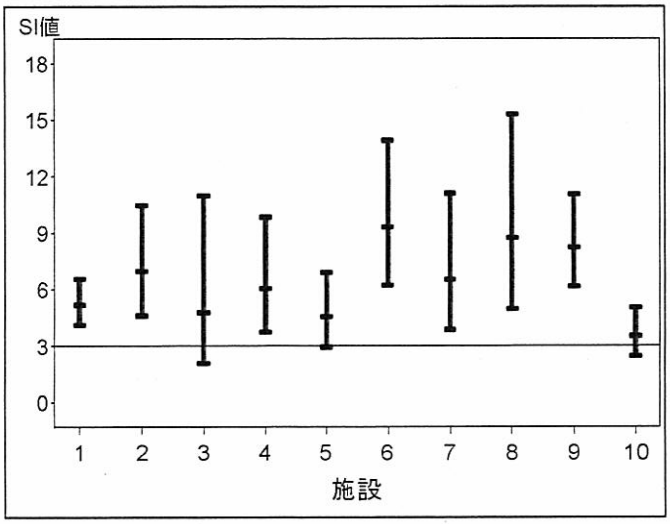



図 3.5.1　予備実験における陽性対照の SI 値とその 95%信頼区間

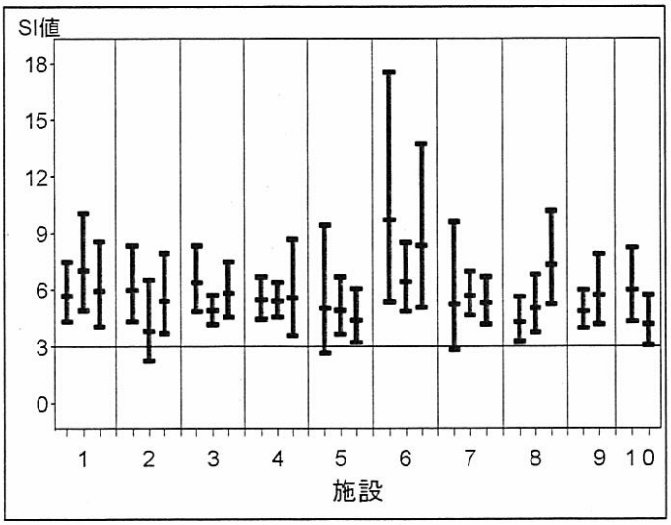



図 3.5.2　本実験における陽性対照の SI 値とその 95%信頼区間

### 3.6 各被験物質の用量反応関係

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

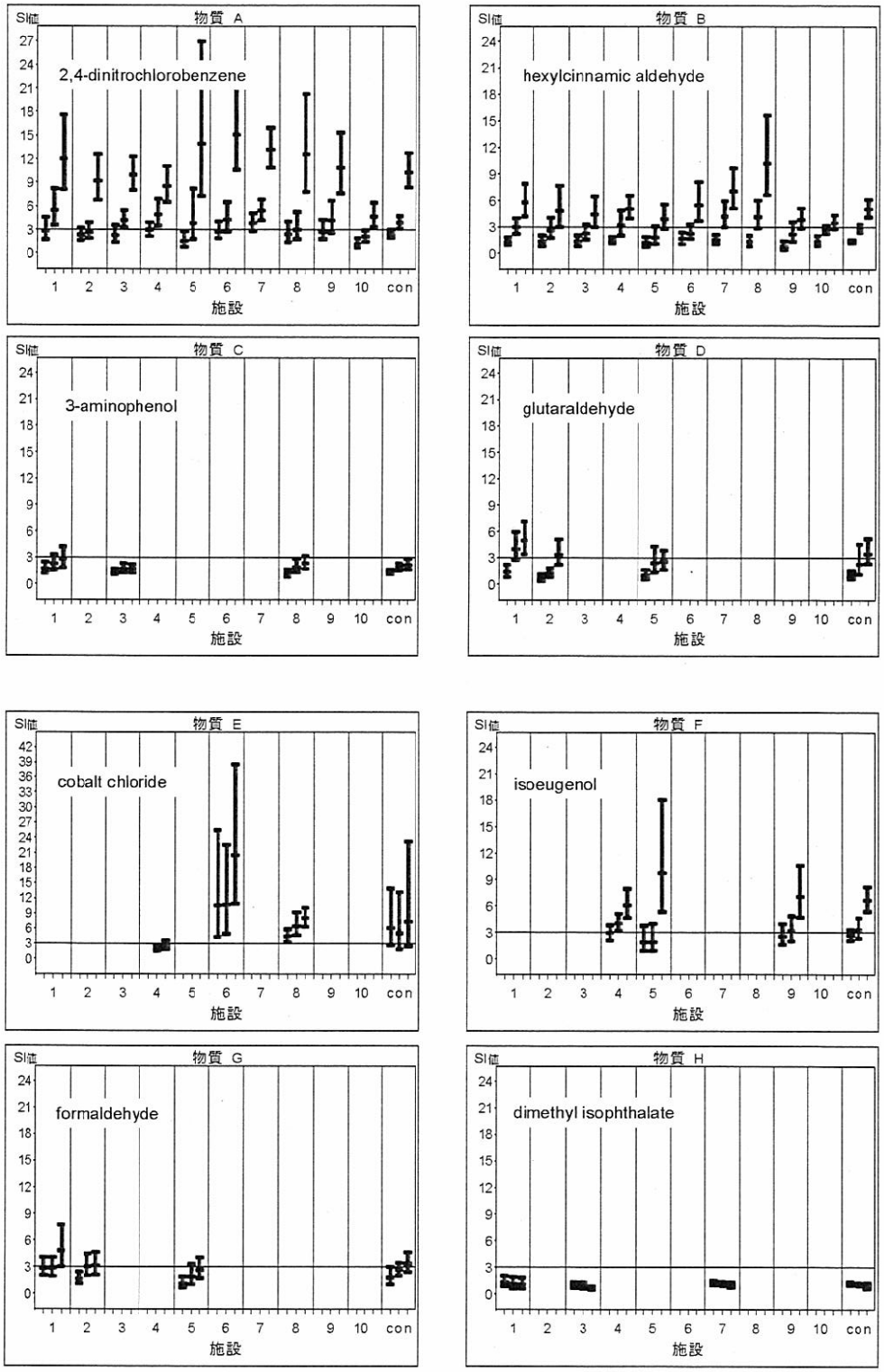



図 3.6.1　SI 値の用量反応関係

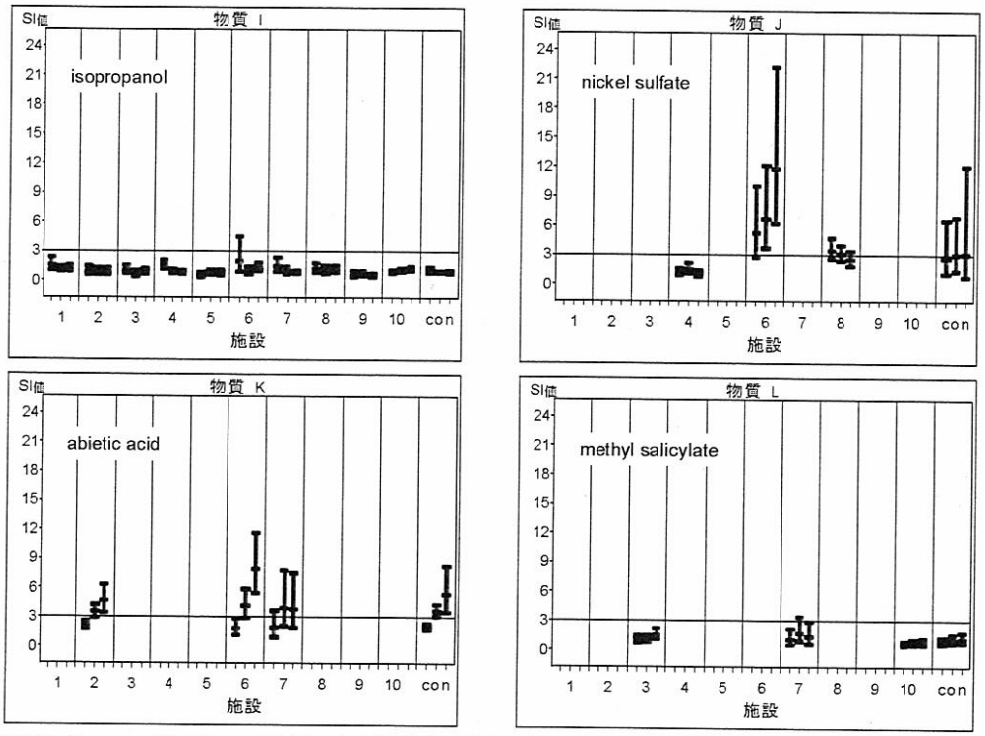



図 3.6.1　SI 値の用量反応関係（続き）

## 3.7 施設間の再現性

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

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

表 3.7.1　各被験物質のばらつきの指標施設間分散の値

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

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

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

表3.7.2　各施設での個々の物質の判定結果

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

*:LLNA法の評価結果に基づく感作性の判定

### 3.8 施設内の再現性

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

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

表 3.8.1　陽性対照による施設内再現性

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

## 3.9 代替可能性

### *3.9.1 感度，特異度，一致割合*

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

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

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

表 3.9.1　GPMT－BT 法と LLNA-DA 法の分割表

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

表 3.9.2　LLNA-DA 法と LLNA 法の分割表

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

表 3.9.3　GPMT－BT 法と LLNA 法の分割表

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

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

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

表 3.9.4　代替可能性の指標

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

＊：被験物質リスト中の判定での結果

### 3.9.2 EC3

SI 値の重み付き平均により求めた EC3 の値を表 3.9.5 に示す.

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

表 3.9.5 EC3 にもとづく感作性の判定

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

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

## 4. 考察

### 4.1 本研究の位置づけと意義

**本研究の位置付け**

OECD（2005）のガイドライン 34 の用語集には，Catch-up バリデーション研究とは"*A validation study for a test method that is structurally and functionally similar to a previously validated and accepted reference test method. The candidate test method should incorporate the essential test method components included in performance standards developed for the reference test method, and should have comparable performance when evaluated using the reference chemicals provided in the performance standards*"であると記載されている．

LLNA-DA 法は LLNA 法におけるエンドポイントの改良法であり，両試験法の原理は同じである．そして，本研究に用いた被験物質は，LLNA 法の性能を評価するために実施された被験物質を用いた．したがって，本バリデーション研究は，上記の Catch-up バリデーション研究に該当するといえるであろう．

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

**本研究の特徴的な点**

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

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

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

の被験物質および陽性対照物質は良好な施設間再現性を示した.

### 4.2 本研究で評価した LLNA-DA 法の操作上の特徴

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

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

### 4.3 本研究の妥当性

#### *4.3.1 被験物質の選択*

本研究では，既知のデータが豊富で LLNA 法での実験結果がわかっている 20 の被験物質のリスト（資料 3）の中から 12 被験物質を選択した.

LLNA 法による文献の EC3 値に基づき感作性を 3 段階（無（negative），弱（weak, moderate），強（strong, extreme））に分類した場合，12 被験物質の感作性の内訳は，無が 4 物質，弱が 4 物質，強が 4 物質である.

#### *4.3.2 データの質に関して*

実施可能性の面から，本研究では，完全な GLP（good laboratory practice）に対応した実験を実施することまではできなかった．しかしながら，データの質を担保するために以下に記載するような配慮をした.

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

実験を実施する前に，すべての施設で使用する ATP 発光量の測定機器の校正

を実施し，問題がないことを確認した．

測定値がこの研究のために準備された一定の書式のデータシート（別添6）に正しく記録されているかどうかを確認するために，データクリーニングが行われ，実験中にデータシートのプリントアウトに入力されたデータと入力されたファイルとの値の整合性が確認された．なお，このデータシートは入力規制機能を用いて，不適切な値が入らないように設計された．

なお，各施設から集められたデータシートの電子ファイルは，プログラムにより一括して読み込まれ，データベースが作成されている．

### *4.3.3 施設内再現性*

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

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

これらの結果から，陽性対照物質での施設内再現性は高いといえる．

### *4.3.4 施設間再現性*

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

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

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

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

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

### *4.3.5 比較対照とした対象となる試験法のデータの妥当性*

対象となる試験法である GPMT/BT 法，LLNA 法の感作性の判定結果は，Haneke ら（2001）と Gerberick ら（2004）の文献の値を用いた．

### *4.3.6 対象となる試験法のデータとの対応性*

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

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

### *4.3.7 個々の被験物質に対する考察*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

それぞれ 4.64，7.96，3.80 とそれほど大きな値ではなかった．

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

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

## 4.4 本研究の限界と今後の課題

本研究にはいくつかの限界がある．以下にこのことについて記載する．

・被験物質について

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

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

・実験施設

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

・本研究特有の事項

本研究では，各被験物質はあらかじめ調製されて実験施設に送付された．こ

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

## 5. 結論

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

## 謝辞

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

本研究は，多くの方の協力を得ました．彼らの協力なしでは本研究を行うことができませんでした．以下の方々に心より感謝いたします．
上森健至（ダイセル化学工業株式会社），山岸学（ダイセル化学工業株式会社），山下邦彦（ダイセル化学工業株式会社），小濱とも子（国立医薬品食品衛生研究所），古谷真美（財団法人食品薬品安全センター），森村智美（財団法人食品薬品安全センター），志田勝彦（財団法人食品薬品安全センター），白石啓二（財団法人化物質評価研究機構），飯田憲二（財団法人化物質評価研究機構），東原信彦（財団法人化物質評価研究機構），森本隆史（住友化学株式会社），正門孝臣（住友化学株式会社），檜垣環（住友化学株式会社），後藤浩彦（大塚製薬株式会社），白石明（明治製菓株式会社），織原由佳里（大正製薬株式会社），山崎紀世（大正製薬株式会社），小宮千春（富士フイルム株式会社），吉野幸江（富士フイルム株式会社），藤島敦（財団法人食品農医薬品安全性評価センター），竹原広（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）

## 参考文献


Basketter, D. A., Scholes, E. W., Kimber, I., Botham, P. A., Hilton, J., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C. and Waite, S. J. (1991) Interlaboratory evaluation of the local lymph node assay with 25 chemicals and comparison with guinea pig test data. *Toxicology Methods* **1**, 30–43.

Basketter, D. A. and Scholes, E. W. (1992) Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. *Food and Chemical Toxicology* **30**, 65–69.

Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I. and Loveless, S. E. (1996) The local lymph node assay: a viable alternative to currently accepted skin sensitization tests. *Food and Chemical Toxicology* **34**, 985–997.

Basketter, D. A., Gerberick, G. F. and Kimber, I. (1998) Strategies for identifying false positive responses in predictive skin sensitization tests. *Food and Chemical Toxicology* **36**, 327–333.

Basketter, D. A., Lea, L. J., Cooper, K. J., Ryan, C. A., Gerberick, G. F., Dearman, R. J. and Kimber, I. (1999) Identification of metal allergens in the local lymph node assay. *American Journal of Contact Dermatitis* **10**, 207–212.

Basketter, D. A., Lea, L. J., Dickens, A., Briggs, D., Pate, I., Dearman R. J. and Kimber I. (1999) A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. *Journal of Applied Toxicology* **19**, 261–266.

Basketter, D. A., Blaikie, L., Dearman, R. J., Kimber, I., Ryan, C. A., Gerberick, G. F., Harvey P., Evans, P., White, I. R. and Rycroft, R. J. G. (2000) Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* **42**, 344–348.

Basketter, D. A., Evans, P., Fielder, R. J., Gerberick, G. F., Dearman, R. J. and Kimber, I. (2002) Local lymph node assay – validation, conduct and use in practice. *Food and Chemical Toxicology* **40**, 593–598.

Basketter, D. A., Casati, S., Gerberick, G. F., Griem P., Philips B. and Worth A. (2005) Skin sensitisation. *Alternatives To Laboratory Animals* **33 suppliment 1**, 83–103.

Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Hattan, D. G. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node

assay. II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **34**, 258–273.

Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kimber, I., Dearman, R. J. and Basketter D. A. (2000) Local lymph node assay: Validation assessment for regulatory purposes. *Toxicology* **11**, 3–18.

Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kern, P. S., Dearman, R. J., Kimber, I., Patlewicz, G. Y. and Basketter, D. A. (2004) A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis* **50**, 274–288.

Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **34**, 274–286.

Kimber, I., Hilton, J., Botham, P. A., Basketter, D. A., Scholes, E. W., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C., Gray, T. J. B. and Waite, S. J. (1991) The murine local lymph node assay: results of an inter-laboratory trial. *Toxicology Letters* **55**, 203–213.

Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Scholes, E. W., Ladics, G. S., Loveless, S. E., House, R. V. and Guy A. (1995) An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. *Toxicology* **103**, 63–73.

Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Lea, L., House, R. V., Ladics, G. S., Loveless, S. E. and Hastings K. L. (1998) Assessment of the skin sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: an interlaboratory evaluation. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **53**, 563–579.

Loveless, S. E., Ladics, G. S., Gerberick G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Scholes, E. W., House, R. V., Hilton, J., Dearman, R. J. and Kimber, I. (1996) Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial. *Toxicology* **108**, 141–152.

Normand, S. L. T. (1999) Meta-analysis: formulating, evaluating, combining, and reporting. *Statistics in Medicine* **18**, 321–359.

OECD (1992) Organization for Economic Co-operation and Development – OECD guidelines for testing of chemicals. No. 406: Skin sensitization.

OECD (2002) Organization for Economic Co-operation and Development – OECD guidelines for testing of chemicals. No. 429: Skin sensitization: Local lymph node assay.

OECD (2005) Organization for Economic Co-operation and Development – OECD series on testing and assessment. No. 34: Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment.

Sailstad, D. M., Hattan, D., Hill, R. N. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. I. the ICCVAM review process. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **34**, 249–257.

Scholes, E. W., Basketter, D. A., Sarll, A. E., Kimber, I., Evans, C. D., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C. and Waite, S. J. (1992) The local lymph node assay: Results of a final inter-laboratory validation under field conditions. *Journal of Applied Toxicology* **12**, 217–222.

Yamashita K., Idehara K., Fukuda N., Yamagishi G. and Kawada N. (2005) Development of a modified local lymph node assay using ATP measurement as an endpoint. *Alternatives to Animal Testing and EXperimentation* **11**, 136–144.

# 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（ホーユー株式会社　総合研究所　基盤技術研究室）
篠田直樹（参天製薬株式会社奈良研究開発センター）
湯浅敦子（富士フイルム株式会社　CSR 推進部　環境・品質マネジメント部
素材試験センター）
牧　栄二（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）

略号の原語または意味

| 略号 | 原語 | 意味 |
|---|---|---|
| ACD | Allergic Contact Dermatitis | |
| 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 sulxocide | |
| 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

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 $^{3}$H-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 $^{3}$H-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 $^{3}$H 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 $^{3}$H 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 sulfoxcide（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.

<u>使用動物</u>：雌の CBA/JNCrlj マウス（8 週齢にて入荷）

<u>投与群設定</u>：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

<u>群あたり動物数</u>：1 群あたり 4 匹

<u>溶媒</u>：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.

<u>測定指標</u>：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）

<u>試験操作</u>： 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 25μL 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．この懸濁液を撹拌し，膜組織を避けて20μL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とのして定義される（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．

（検出限界）＝1.85×（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らないことを条件とした．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　ソフトウエア*

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 |
| C | 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 | - | |
| D | E cobalt chloride | 14 | - | |
| | | 13 | - | |
| | | 17 | - | |
| | | 11 | - | |
| E | N potassium dichromate | 12 | 固化 | 溶解確認後適用 |
| | | 15 | 凝固 | 溶解確認後適用 |
| | | 17 | - | |
| | | 11 | - | |

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 |
| 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 |
| 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 |
| E: cobalt chloride | DMSO | 4 | 82093 | 26296 | 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 |
| J: nickel sulfate | DMSO | 4 | 82093 | 26296 | 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発光量の間に直線的な関係があることがわかる．ATP発光量は時間の経過とともに減少するので，操作時間を概ね一定にしなければ適切な値を得ることができない．被験物質の影響が強いほどリンパ節重量は増加するので，ATP発光量とリンパ節重量の間に直線的な関係がみられることは，各施設とも操作時間が厳密に遵守され，適切な操作で行われたことを示しているといえるであろう．

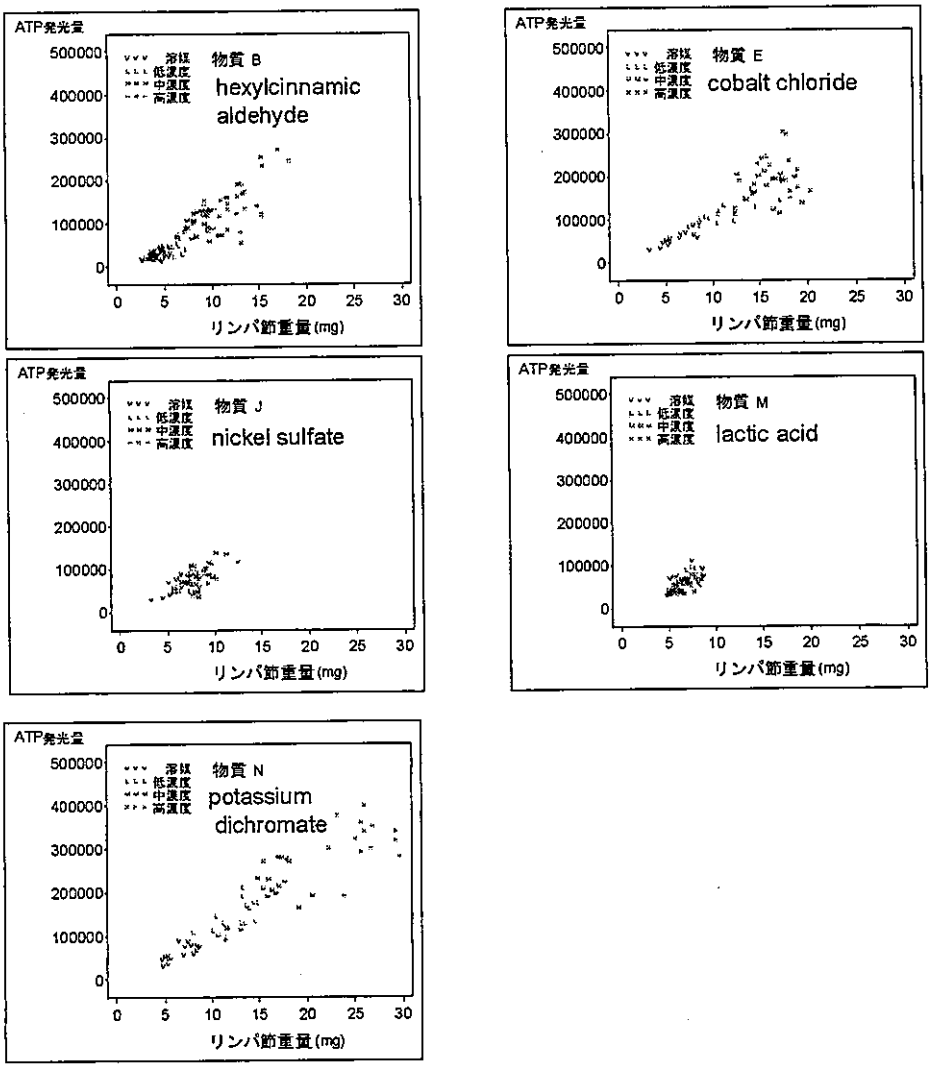



図3.4.1　リンパ節重量とATP発光量の関係

### 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．

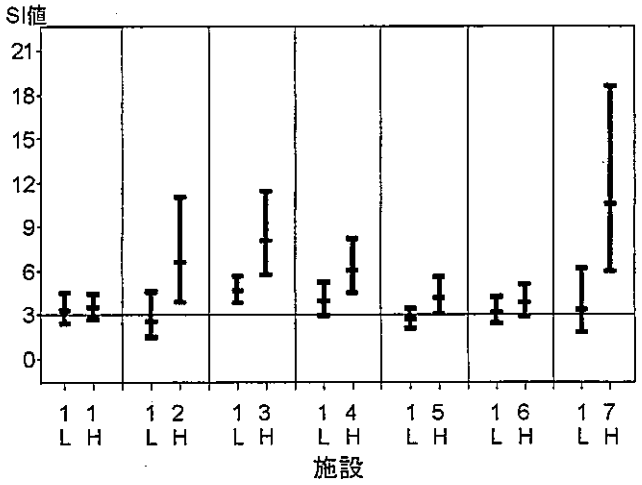



図 3.5.1　予備実験における陽性対照の SI 値とその 95%信頼区間

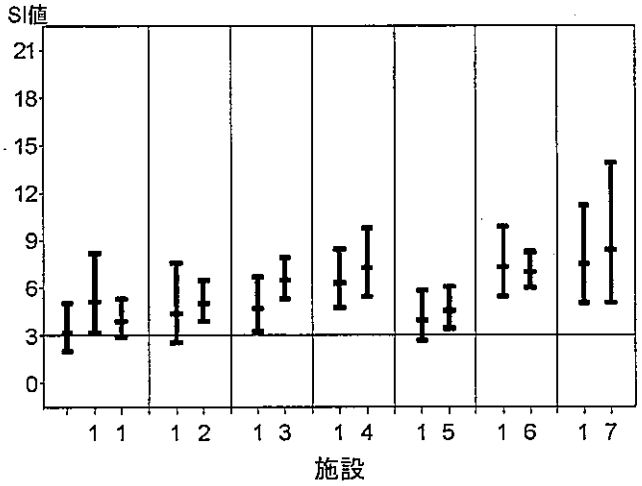



図 3.5.2　本実験における陽性対照の SI 値とその 95%信頼区間

### 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）

| | | 施設 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 被験物質 | 濃度 | 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）

| | | 施設 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 被験物質 | 濃度 | 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）

| | | 施設 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 被験物質 | 濃度 | 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）

| | | 施設 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 被験物質 | 濃度 | 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 |

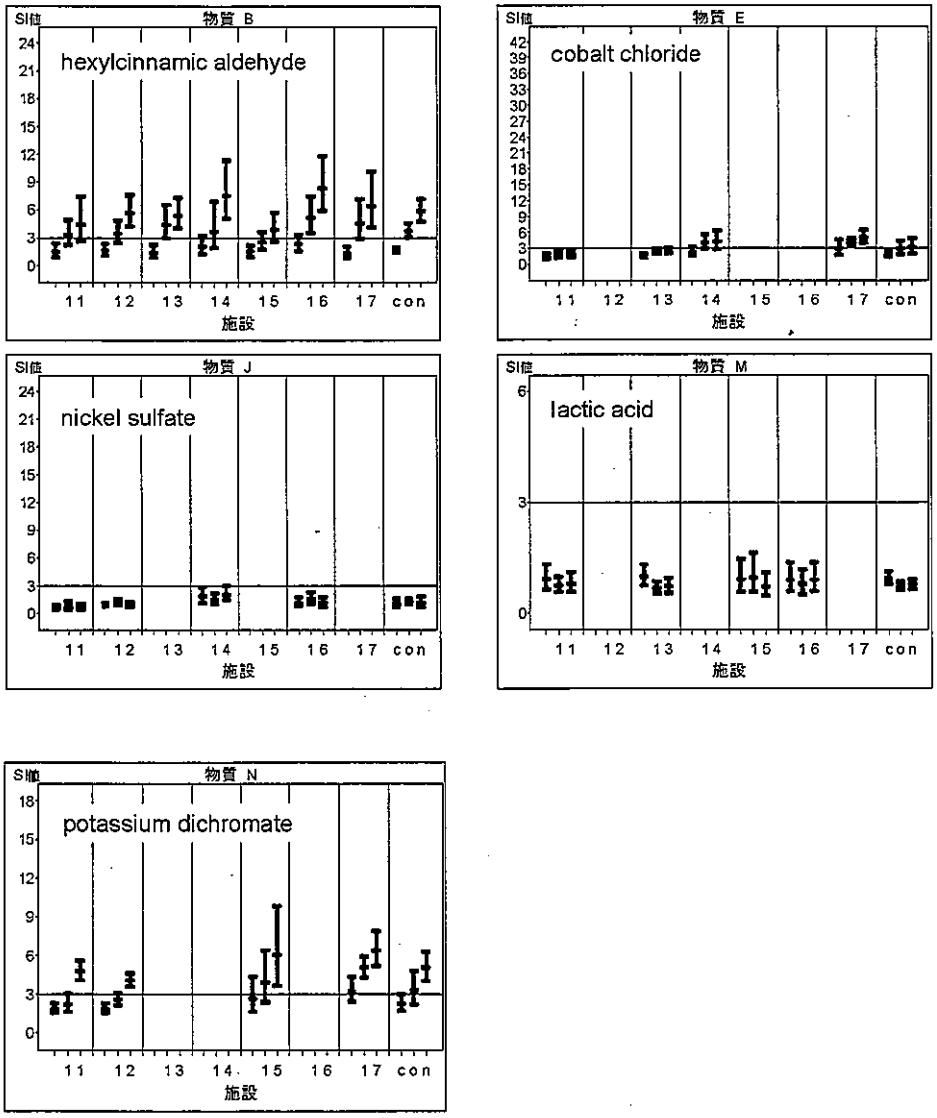



図 3.6.1　SI 値の用量反応関係

## 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

| | 低濃度 | | | 中濃度 | | | 高濃度 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 被験物質 | 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 からも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とすることにした．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らないように，この研究で特に以下の点について注意を促した．

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

## 4.3 本研究の妥当性

### *4.3.1 被験物質の選択*

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 回の繰り返しがある．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の指標 $\exp(\tau^2)$で実験間の再現性を評価した場合，その値は施設によって 1.00 から 1.03 の範囲であった（表 3.8.1）．この結果は第 1 実験の結果とほぼ同等であった．

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 施設で実験を行った物質 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 施設で実験を行った残り 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った．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, C | | | 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 | n | 平均値 | 標準偏差 |
| 4 | 17947 | 4929 | 4 | 38044 | 13217 | 4 | 16439 | 6488 |
| 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 | n | 平均値 | 標準偏差 |
| 4 | 100396 | 24632 | 4 | 4184 | 2395 | 4 | 19803 | 4451 |
| 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 | 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 | 4 | 5.9 | 1.3 |
| E, J | | | J, N | | | E, M | | | E, J | | | M, N | | |
| 4 | 8.1 | 0.7 | | | | | | | | | | | | |
| M, N | | | | | | | | | | | | | | |

| 施設 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 16 | | | 17 | | |
| n | 平均値 | 標準偏差 | n | 平均値 | 標準偏差 |
| 4 | 5.9 | 1.1 | 4 | 5.1 | 0.3 |
| 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．

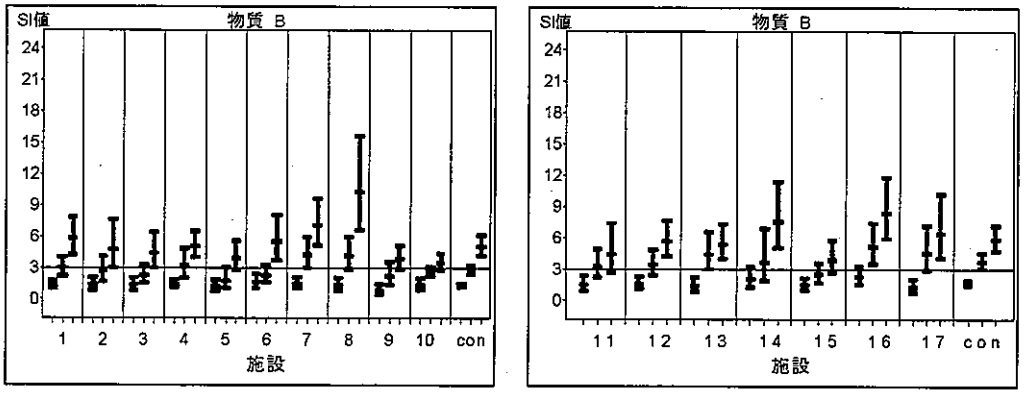



図 4.4.1　hexylcinnamic aldehyde の用量反応関係（全 17 施設）

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．

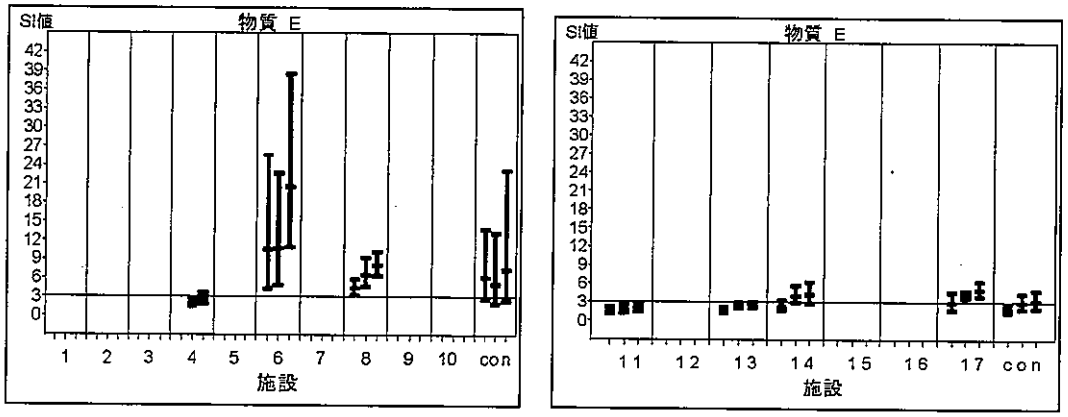



図 4.4.2　cobalt chloride の用量反応関係

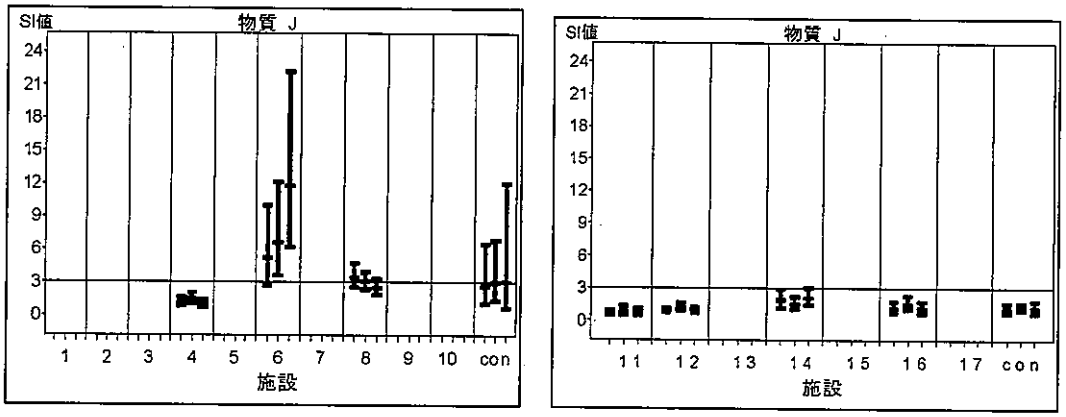



図 4.4.3　nickel sulfate の用量反応関係

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 suppliment 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.

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。

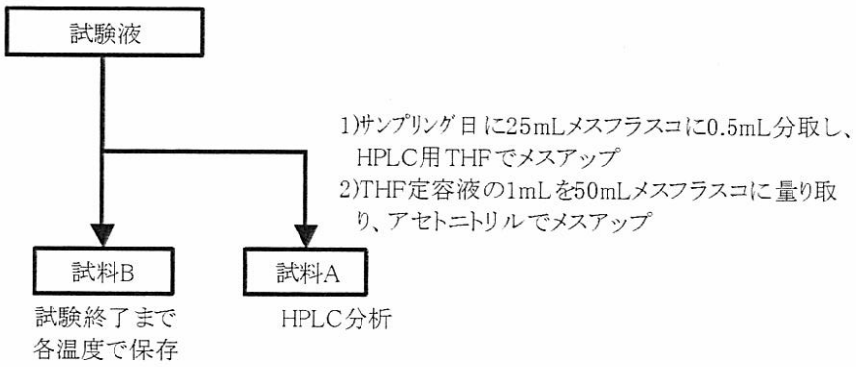
3. 試験番号
E-398

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

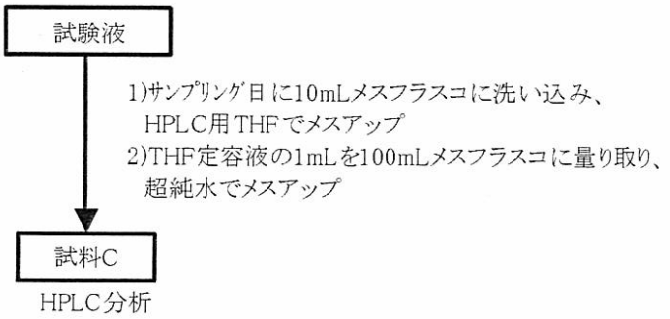
6. 試験方法
(1) アビエチン酸、HCA
被験物質 2.5g を 10mL メスフラスコに精密に秤り取り、AOO 溶液を加えて溶解し、定容した。この試験液0.5mL を 25mL メスフラスコに量り取り(0 日目のサンプリング)、HPLC 用 THF で定容した液 1mL を 50mL メスフラスコに量り取り、アセトニトリルで定容し、HPLC 分析により濃度を求めた。この 0 日目のサンプリングを行った後、試験液を半量になるようにサンプル瓶 2 つに小分けし、4℃及び 25℃で保存し、適時サンプリングを行い、濃度の経時変化を見た。




＜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。




＜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™2 |

(2) 分析条件

① 試料 A

| | |
|---|---|
| カラム | : Atlantis T3 3μm (φ2.1mm×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 | : 5μL |

② 試料 C

| | |
|---|---|
| カラム | : Atlantis T3 3μm (φ2.1mm×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 | : 5μL |

(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 |

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

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

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

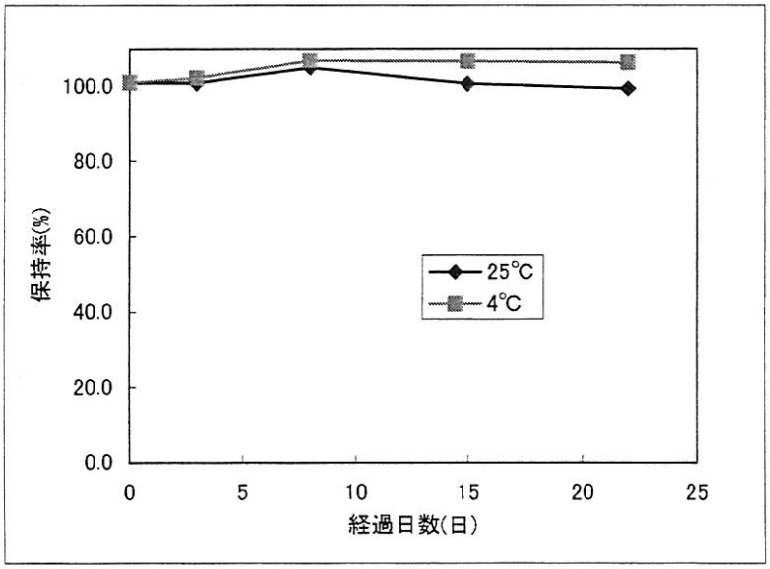



図 1　アビエチン酸の濃度経時変化

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

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

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

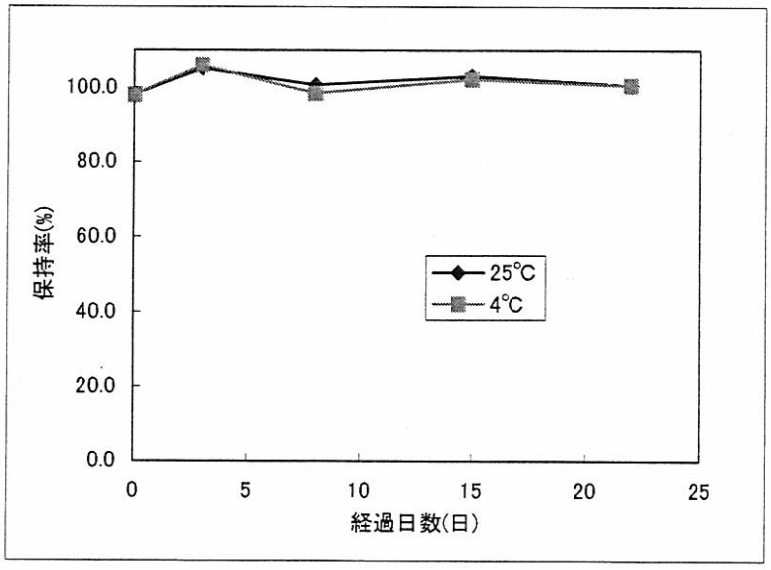



図 2　HCA の濃度経時変化

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

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

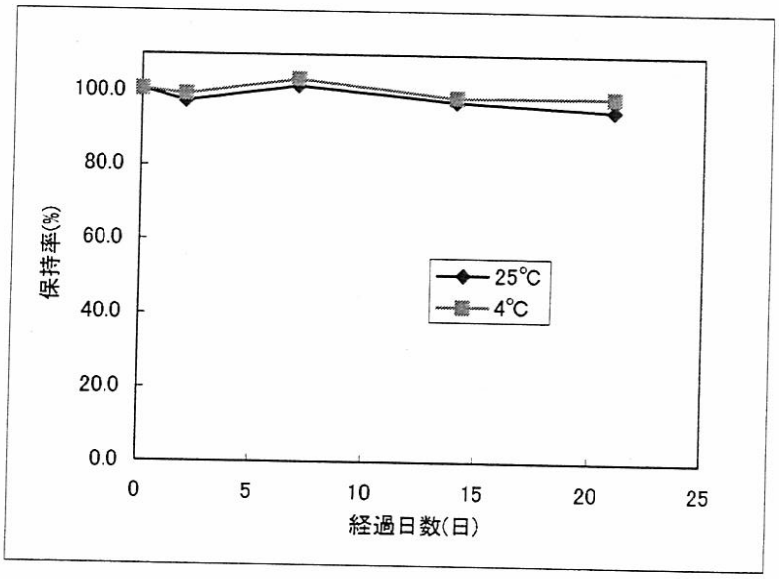
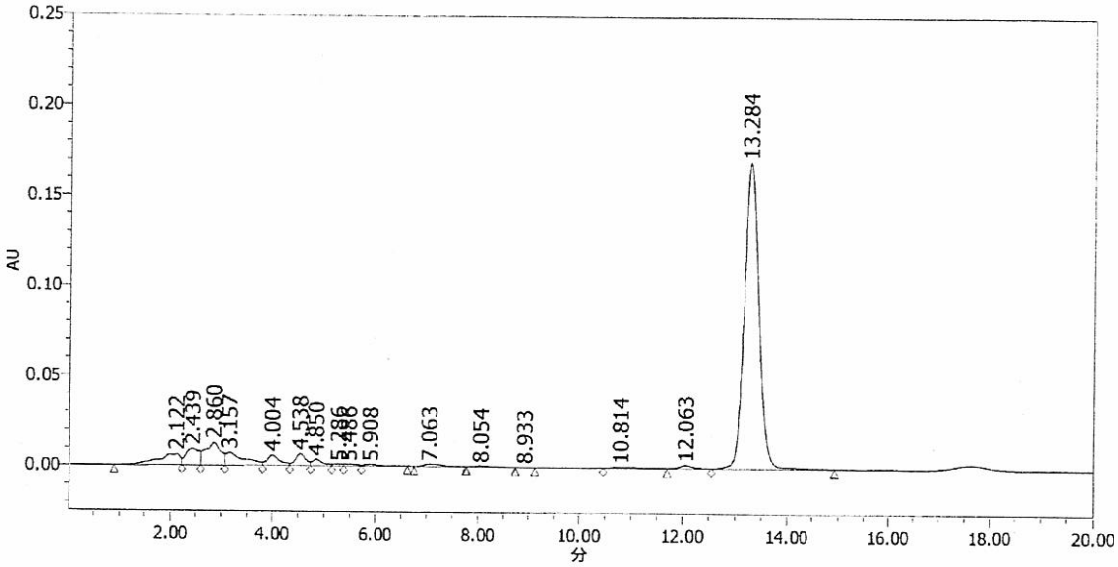


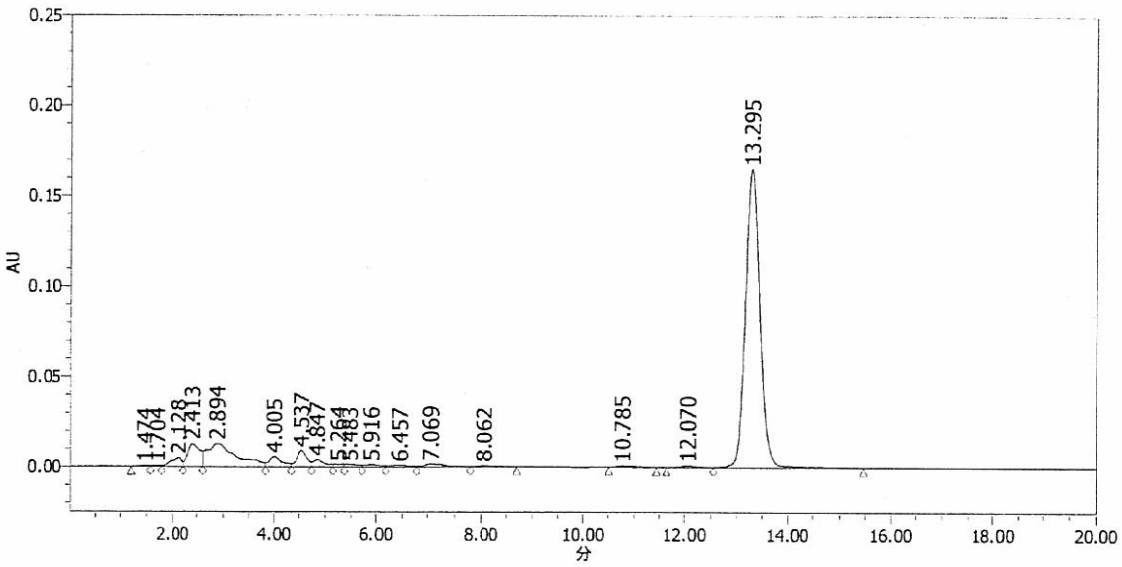

図 3　3-AP の濃度経時変化




| | 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 |

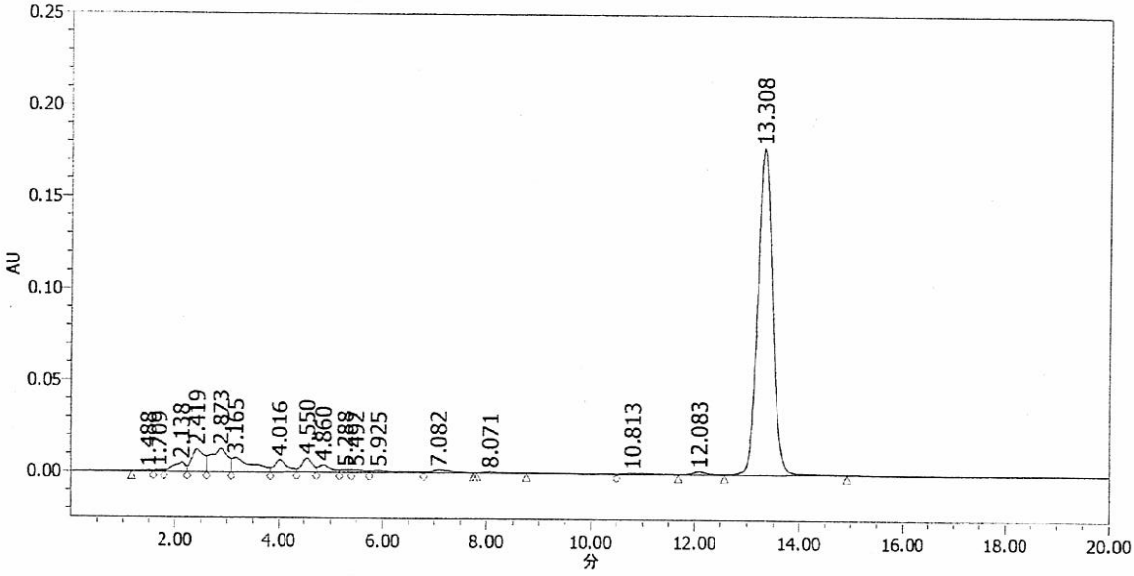
図 4-1　アビエチン酸の HPLC クロマトグラム(22 日目、101.3mg/L 標準液)




| | 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 |

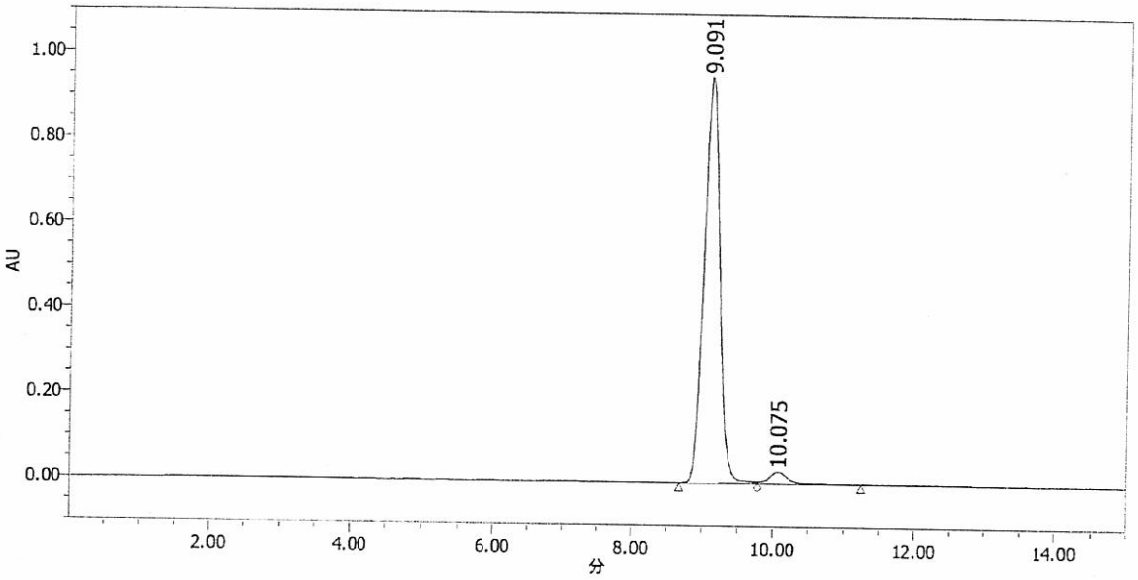
図 4-2　アビエチン酸の HPLC クロマトグラム(22 日目、25℃)




| | 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 |

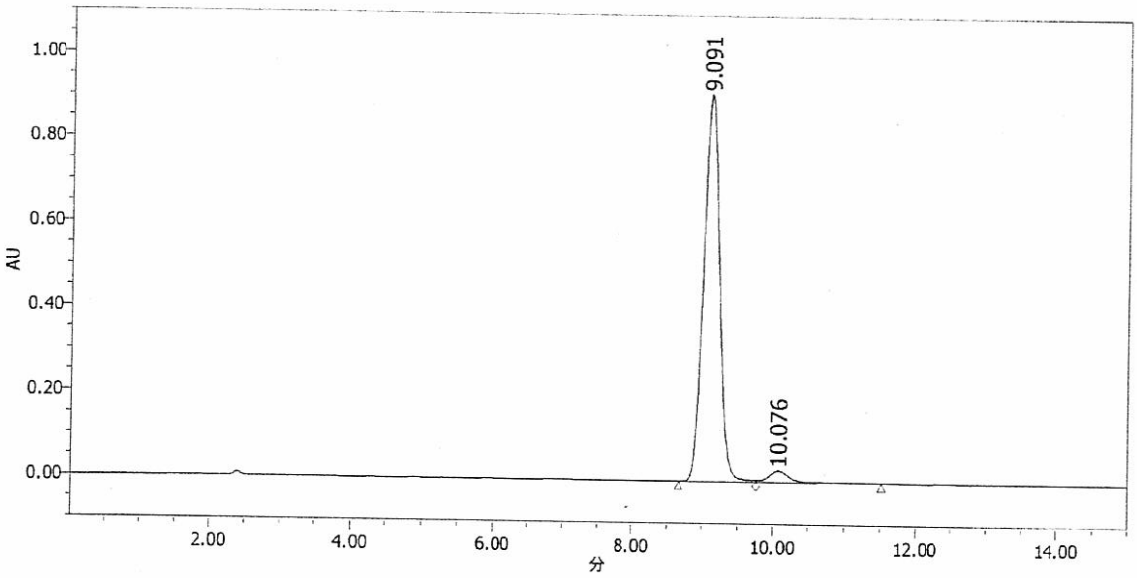
| | 保持時間 (分) | 面積 (μV秒) | 高さ (μV) | %面積 |
|---|---|---|---|---|
| 16 | 12.083 | 28541 | 1591 | 0.61 |
| 17 | 13.308 | 3503357 | 178355 | 74.58 |

図 4-3　アビエチン酸の HPLC クロマトグラム(22 日目、4℃)



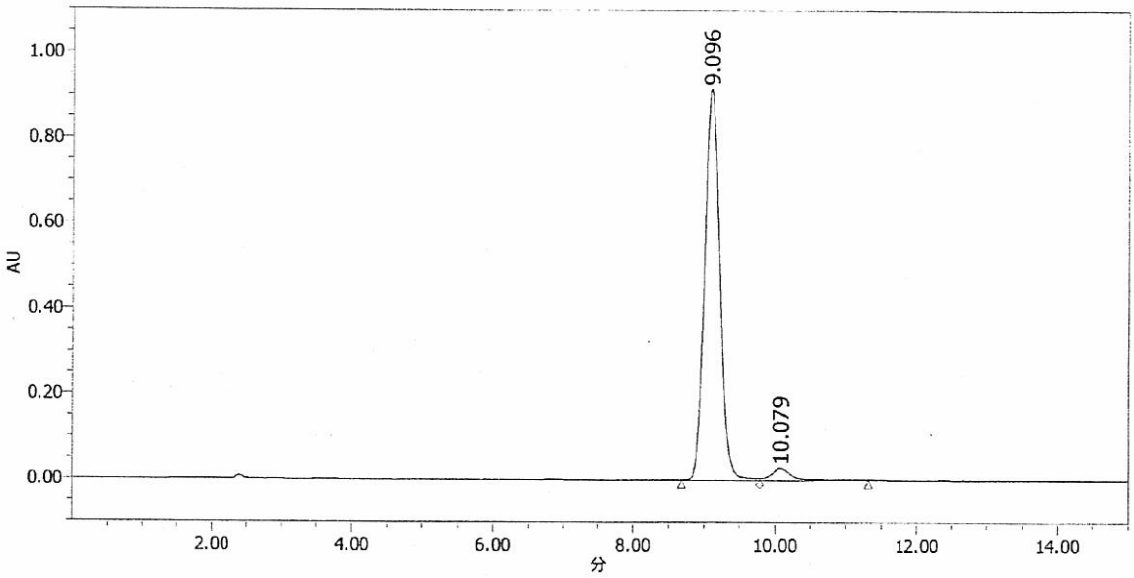

| | 保持時間 (分) | 面積 (μV秒) | 高さ (μV) | %面積 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 9.091 | 14525574 | 956003 | 96.50 |
| 2 | 10.075 | 527450 | 27752 | 3.50 |

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



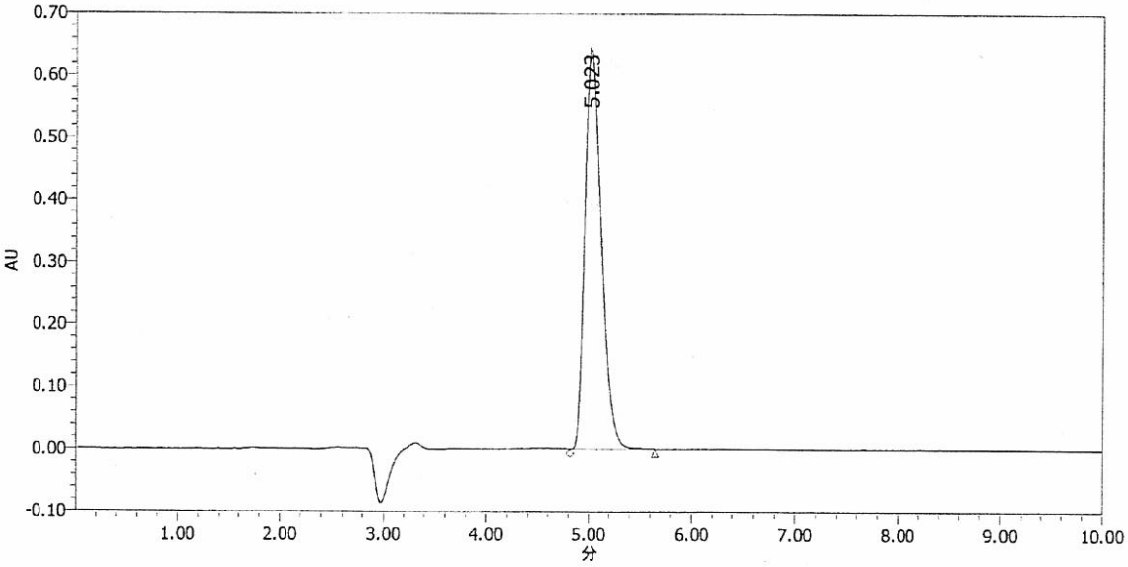

| | 保持時間 (分) | 面積 (μV秒) | 高さ (μV) | %面積 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 9.091 | 14032345 | 916076 | 96.38 |
| 2 | 10.076 | 527724 | 27239 | 3.62 |

図 5-2　HCA の HPLC クロマトグラム(22 日目、25℃)



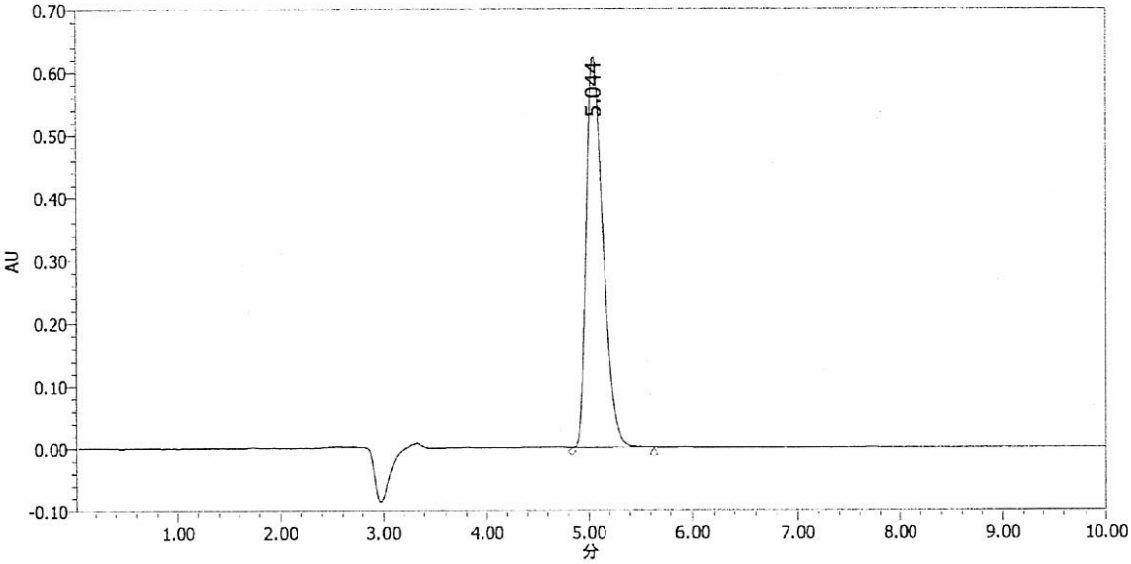

| | 保持時間 (分) | 面積 (μV秒) | 高さ (μV) | %面積 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 9.096 | 14034343 | 916932 | 96.35 |
| 2 | 10.079 | 531801 | 28128 | 3.65 |

図 5-3　HCA の HPLC クロマトグラム(22 日目、4℃)



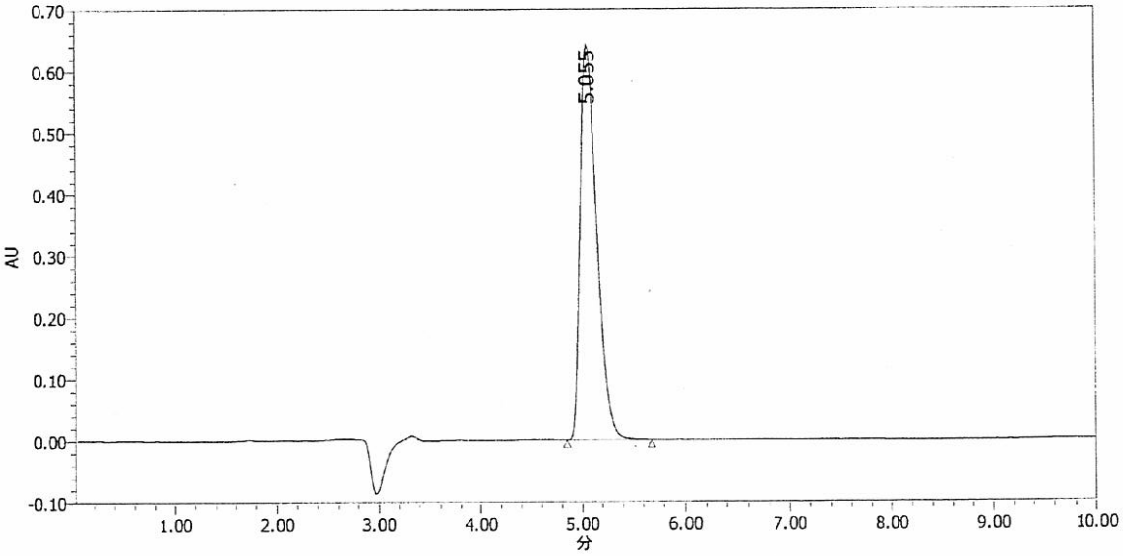

| | 保持時間 (分) | 面積 (μV秒) | 高さ (μV) | %面積 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 5.023 | 7396330 | 647096 | 100.00 |

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%（$\kappa$=0.850）、GPMT/BA の結果に対する一致率は 80%（$\kappa$=0.525）、HMT/HPTA の結果に対する一致率は 79 %（$\kappa$=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) | | | ATP content(RLU) | | | EC3 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Average ± S. E. | SI ± S. E. | | Average ± S. E. | SI ± S. E. | | |
| 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) | | | ATP content(RLU) | | | EC3 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Average ± S. E. | SI ± S. E. | | Average ± S. E. | SI ± S. E. | | |
| 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 ± 3683 | 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) | | | ATP content(RLU) | | | EC3 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Average ± S. E. | SI ± S. E. | | Average ± S. E. | SI ± S. E. | | |
| 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 | ACO | 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 | ACO | 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 | ACO | 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 | ACO | 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 | Negative |
| LLNA-DA | Positive | 2,4-Dinitrochlorobenzene<br>*p*-Phenylene diamine<br>Cinnamaldehyde<br>Isoeugenol<br>Eugenol<br>Abietic acid<br>Imidazolidinyl urea<br>Trimellitic anhydride<br>Pthalic anhydride<br>Glutaraldehyde<br>Formaldehyde<br>Hydroxycitronellal<br>Resorcinol<br>Toluene diisocyanate<br>Hexylcinnamic aldehyde<br>Citral<br>$CoCl_2$<br>$K_2Cr_2O_7$<br>SLS<br>*19chemicals* | Benzalkonium chloride<br>*1chemical* |
| | Negative | Mercaptobenzothiazol<br>*1chemical* | 1-Bromobutane<br>Diethylphthalate<br>Propyl paraben<br>Methyl salicylate<br>Chlorobenzene<br>Lactic acid<br>$NiSO_4$<br>Hexane<br>Isopropanol<br>*9chemicals* |

| Comparison | No. of comparisons | Sensitivity | Specificity | Positive Predictivity | Negative Predictivity | Accuracy |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LLNA-DA vs LLNA | 30 | 95%<br>( 19 / 20 ) | 90%<br>( 9 / 10 ) | 95%<br>( 19 / 20 ) | 90%<br>( 9 / 10 ) | 93%<br>( 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 | Negative |
| LLNA-DA | Positive | 2,4-Dinitrochlorobenzene *15chemicals*<br>*p*-Phenylenediamine<br>Pthalic anhydride<br>Formaldehyde<br>Cinnamic aldehyde<br>Isoeugenol<br>Eugenol<br>Abietic acid<br>Hydroxycitronellal<br>Imidazolidinyl urea<br>Benzocaine<br>$K_2Cr_2O_7$<br>$CoCl_2$<br>Hexylcinnamic aldehyde<br>Citral | Resorcinol *3chemicals*<br>SLS<br>Benzalkonium chloride |
| | Negative | Mercaptobenzothiazol *2chemicals*<br>$NiSO_4$ | Propyl paraben *5chemicals*<br>Methysalicylate<br>Chlorobenzene<br>Lactic acid<br>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*<br>Formaldehyde<br>Cinnamic aldehyde<br>Isoeugenol<br>Eugenol<br>Resorcinol<br>Abietic acid<br>Citral<br>Hydroxycitronellal<br>Imidazolidinyl urea<br>Benzalkonium chloride<br>$K_2Cr_2O_7$<br>$CoCl_2$ | SLS *1chemical* |
| | Negative | Mercaptobenzothiazol *3chemicals*<br>$NiSO_4$<br>Propyl paraben | Methysalicylate *2chemicals*<br>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.

添付資料５

代替試験法申請書

皮膚感作性試験：LLNA－DA 法

2004年　1月15日

# 代替試験法申請書類

# 皮膚感作性試験：LLNA - DA法

ダイセル化学工業株式会社

評価解析センター

出原賢治、山下邦彦、福田徳雄、山岸学、河田直紀

## 目次

## Abbreviations

| | |
|---|---|
| AMR | ATP Monitoring Reagent |
| AOO | Acetone-Olive Oil (4:1, v/v) |
| ATP | Adenosine 5'-triphosphate |
| BA | Beuhler Assay |
| BrdU | Bromodeoxyuridine |
| BzC | Benzalkonium chloride |
| DMF | *N, N*-Dimethyl formamide |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| DNCB | 2,4-Dinitrochlorobenzene |
| DPM | Disintegrations Per Minute |
| EPA | United States Environmental Protection Agency |
| FCA | Freund's Complete Adjuvant |
| FDA | Food and Drug Administration |
| GPMT | Guinea Pig Maximization Test |
| HCA | Hexylcinnamic aldehyde |
| HMT | Human Maximization Test |
| HPTA | Human Patch Test Allergen |
| $^{3}$H-TdR | $^{3}$H-methyl thymidine |
| ICCVAM | Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods |
| $^{125}$IU | $^{125}$I-iododeoxyuridine |
| IL-2 | Interleukin Type 2 |
| LLNA | Murine Local Lymph Node Assay |
| LN | Lymph Node |
| LLNA-DA | modified LLNA of Daicel based on ATP content |
| L-L法 | Luciferin-Luciferase method |
| MBT | 2-Mercaptobenzothiazol |
| MEK | Methyl ethyl ketone |
| NRR | Nucleotide Releasing Reagent |
| OECD | Organization for Economic Cooperation and Development |
| OSHA | Occupational Safety & Health Administration |
| PCNA | Proliferating Cell Nuclear Antigen |
| PG | Propylene glycol |
| pPDA | *p*-Phenylene diamine |
| RI | Radioisotope |
| RLU | Relative Light Unit |
| SDS | Sodium lauryl sulfate |
| SI | Stimulation Index |
| TMA | Trimellitic anhydride |

## 緒言

化学物質の皮膚感作性による接触過敏症は、重要な問題として注目を集めている。多くの化学物質を取り扱う弊社においても、皮膚感作性のリスク評価は重要な項目の一つとなっている。リスク評価を適切に行うためにも、化学物質の持つ感作性ポテンシャルを検出する試験系の重要性はますます高まっている。

皮膚感作性の試験としては、guinea pig を用いた試験法が最も一般的に用いられてきており、OECD ガイドラインに記載されている試験法としては 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評価することにより、guinea pig に対する化学物質の感作性の有無を検出できる。長年にわたり多くの機関で用いられてきた実績があり、蓄積データも豊富である。しかしながら、試験に 5 週間を要する事に加え、作業負荷やコストの面から、弊社で取り扱う膨大な化学物質すべてについて実施する事は困難であった。同時に動物に対する負荷も比較的高いといえる。

1986 年に I. Kimber らにより提案された Local lymph node assay（LLNA）は、感作誘導期における局所リンパ節中の細胞増殖反応を指標としたマウスを用いる皮膚感作性試験法である。既に ICCVAM による代替法評価を経て、独立した試験法として OECD ガイドラインに受け入れられた（2002 年）。さらに EPA、FDA、OHSA でも独立した試験法として受け入れられている。

LLNA は guinea pig を用いる試験法と比較すると、以下のような多くのメリットがある。

- 試験期間が約 1 週間と短い
- 結果が定量的である
- 用量依存性の評価が出来る
- 動物へのストレスを低減できる
- 使用動物数の大幅な削減が可能
- コストの削減が可能
- 着色した被験物質も評価できる
- マウスは免疫に関する研究がより進んでいる
- 感作誘導期の評価であるため、将来的にメカニズムの面からの研究や試験法の進歩が期待できる

試験期間が短く低コストである（作業負荷も少ない）ことから、LLNA はより実用的である。また、3R については、Replacement には該当しないものの、動物使用数の削減が可能であり（Reduction）、試験期間が短く、長時間の閉塞貼付や GPMT で用いる Freund's Complete Adjuvant を使用しないなど、動物の苦痛を大幅に削減できるため（Refinement）、LLNA の普及は動物福祉の観点からも意義深いといえる。欧米では LLNA による感作性データが蓄積しつつある。化学物質のポテンシャルを定量的かつ用量依存的に評価できるこ

とは、リスクアセスメントへの利用の点でも好ましい。

しかしながら、LLNA における細胞増殖反応の検出は放射性同位元素（RI）の取り込みを基礎としており、操作上、RI のマウスへの尾静脈投与を必要とする。このため、主に放射性廃棄物を生じる問題から、簡便に使用できる方法とは言えない。このことは、日本において LLNA が広範に普及する事を妨げている一因であると思われる。既に、RI を使用せずに細胞増殖を検出する改変法として、BrdU の取り込みや IL-2 の産生量を ELISA で測定する方法をはじめ幾つかの報告があり、OECD ガイドラインでも、充分な科学的根拠があれば RI 法以外の指標を用いることが出来るとしている。残念ながら、充分にバリデートされ、公的に認められた非 RI 法は今のところまだ無い。また、報告されている方法は検出感度が LLNA に対し低いように思われる。

弊社では、LLNAと同等の感度を持ち、かつ簡便で実用性のある非RI-LLNAの開発を目的として検討した。その結果、感作誘導期のリンパ節に含まれるATP量を指標とすることにより、非常に簡便な非RI-LLNA法（LLNA-DA）を開発した。LLNAで既に評価されている 17 検体について評価したところ、LLNA-DAによる結果はLLNAの結果とよく一致し、さらに$EC_3$が概ね一致することから、ほぼ同等の感度を持つ事が期待できるに至った。LLNA-DAは、guinea pigを用いる試験法に対するLLNAのメリットをほぼ同様に持っている。即ち、主に実用性、動物福祉、リスクアセスメントへの利用の点で優れている。実験操作はLLNAより更に簡便であり、RIを使用しないことから多くの施設で容易に実施できるものと思われる。したがって、guinea pigを用いる試験法からの移行をより促進できると期待される。

LLNA の代替法として、LLNA-DA を提案したい。

## 資料１）代替しようとする試験法の名称および代替法の名称

—代替しようとする試験法の名称

Local Lymph Node Assay (LLNA) の代替法として LLNA-DA (modified LLNA of Daicel based on ATP content) を提案する。

## 資料２）LLNA に関する資料

—代替しようとする *in vivo* 試験法に関する資料（プロトコール，再現性，特異性，予測性についての記述を含む）

### 2-1　Local lymph node assay（LLNA）

LLNA は、マウスを用いて化学物質の感作性を評価する試験方法であり、1986 年に Kimber らにより提案された(1)(2)(3)。1992 年には、皮膚感作性のスクリーニング゛テストとして OECD ガイドライン４０６に記載され、その後、多くの研究者により検証が行われた。1998 年には G. F. Gerberick、I. Kimber、D. A. Basketter の提案に基づき ICCVAM による評価が行われ、その結果、LLNA は皮膚感作性評価のための独立した代替法として認められた(4)(5)(6)(7)。ただし、ICCVAM は提案されたプロトコールに幾つかの改善を推奨している（リンパ節のプールは群ごとではなく個体ごとに行うこと、陽性対照を設けること、判定にあたって用量依存性および統計的有意差を考慮すること）。ICCVAM の推奨を基礎として、EPA、FDA、OSHA により、LLNA は Guinea pig maximization test（GPMT）の代替法として受け入れられた(5)(8)(9)。2002 年には OECD ガイドライン４２９に採用され、LLNA は充分にバリデートされ、皮膚感作性試験の独立した代替法であるとされている(10)。

LLNA は皮膚感作導入期における反応、即ち化学物質との接触により引き起こされる所属リンパ節のリンパ球増殖を指標として評価する点が特徴的である。従って、guinea pig を用いる試験のような感作誘発期の評価を必要としない。そのため、試験期間を大幅に短縮する事が可能である。また、広範に実施されてきた GPMT で使用されるアジュバント（Freund's Complete Adiuvant、FCA）は LLNA では必要としない事に加え、試験期間が短く、長時間にわたる被験物質貼付を避けられるなど、動物の受けるストレスと苦痛はかなり低減される。さらに１検体の評価に必要な動物数も削減できる可能性があり、LLNA の普及は動物福祉の観点からも意義深いと考えられる。guinea pig を用いる試験と比較すると、試験に掛かるコストも大幅に削減できる事が見込まれる。

リンパ球増殖の評価は、放射性元素（RI）で標識された核酸構成成分の取り込み量をエンドポイントとして行われる。被験物質をマウス耳介に３日間連続で塗布し、６日目に $^{3}$H-methyl thymidine または $^{125}$I-iododeoxyuridine を静脈内投与、５時間後に摘出したリンパ節より調製されたリンパ球懸濁液の放射線強度を細胞増殖の指標としている。被験物質投与動物群における放射線強度の溶媒コントロール群に対する比を SI 値（Stimulation Index）とし、SI 値が３を超えるとき陽性と判定される。従来の試験法と比較して、より定量的かつ客観的な結果を得ることが出来る。また、リンパ球の増殖は接触した感作性物質の量および感作性能と相関しておこるため、用量依存性がある。

RI の動物への使用は、特に廃棄物の問題があるため簡便に使用できる方法とは言い難い。OECD ガイドライン４２９は、充分な科学的根拠があるならば、細胞増殖の指標としてこれ

以外のエンドポイントを使用できる可能性があるとしており、RI 法を唯一のエンドポイントとして限定するものではない。既に、非 RI の代替エンドポイントとして、BrdU の取り込み、IL-2 の産生、PCNA 発現量の測定等が提案されている(11)(12)(13)。しかしながら、充分にバリデートされ、公的に認められた非 RI 法はまだ無いのが現状である。

LLNAの細胞増殖活性には用量依存性があるため、SI値が 3 になると予測される濃度を外挿により求める事が出来る（$EC_3$）。$EC_3$は下記の等式で求められる。

$$EC_3 = c + [\ (3-d)\ /\ (b-d)\ ] \times (a-c)$$

SI 値＝3 となる直後および直前の 2 点（用量, SI 値）をそれぞれ（$a, b$）、（$c, d$）とする。

$EC_3$の値は被験物質の感作性能が強いほど低い値を示す。D. A. Basketterらは、ヒトにおける感作性物質を感作性強度により 5 つのランクに分類し、その$EC_3$との比較を行った。その結果、感作性強度と$EC_3$とは非常によく相関する事が示された(14)。この結果から、LLNA は化学物質のリスクアセスメントにも応用できるものと期待される。

## 2-2　LLNA のプロトコール

主に OECD ガイドライン 429 の記述を基に、以下に記述する(10)(9)(15)。

### 2-2-1　使用動物

LLNA にはマウスを用いる。CBA/Ca または CBA/J の出産および妊娠経歴のない雌で試験開始時に 8~12 週齢のものを使用する。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。5 日以上の馴化の後、皮膚に異常が認められない動物を試験に供する。

### 2-2-2　投与群の設定

1 群 4 匹以上とし、被験物質あたり 3 用量以上を設定する。個々の動物についてデータを取る場合 1 群を 5 匹以上とする。推奨されている投与用量は、100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%・・の系列から、連続した 3 用量以上である。被験物質に急性毒性あるいは皮膚刺激性がある場合は、それを考慮して最高用量を設定する。

使用溶媒（Vehicle）は被験物質の溶解性を考慮し、溶液または懸濁液として最も高濃度で投与可能な Vehicle を選択する。OECD で推奨されている Vehicle の優先順位は、Acetone/olive oil（4:1 v/v、AOO）、Dimethylformamide（DMF）、Methyl ethyl ketone（MEK）、Propylene glycol（PG）、Dimethyl sulfoxide（DMSO）である。ただし、その他の Vehicle も充分な科学的根拠があれば使用可能とされている。

陰性対照群として、試験に使用した Vehicle の投与群を設ける。また、試験の信頼性を確保するため、陽性対照群を設ける。陽性対照物質は、LLNA において陽性となる事が確認されている物質を用い、SI 値が 3 を超える濃度で使用する。OECD では Hexyl

cinnamic aldehyde（HCA、CAS No: 101-86-0）、Mercaptobenzothiazol（MBT、CAS No: 149-30-4）を推奨している。

陰性対照群および陽性対照群は試験群と同じ操作で並行して行う。

2-2-3　投与日程

・ Day 1 ：

マウスの体重を個別に測定し、マーキングする（耳介へのマーキングは避ける）。各濃度に調製した被験物質溶液または懸濁液、および Vehicle、陽性対照物質溶液を、マウスの両耳介背面に滴下し開放曝露させる。滴下量は、耳介あたり 25μL（50μL/animal）とする。

・ Day 2、Day 3 ：

Day 1 と同じ開放曝露を行う。

・ Day 4、Day 5

特に処置しない。

・ Day 6 ：

マウスの体重を個別に測定する。

$^{3}$H-methyl thymidine（$^{3}$H-TdR）のリン酸バッファー（PBS）溶液 250μL（20μCi）または$^{125}$I-iododeoxyuridine（$^{125}$IU）および $10^{-5}$M FluorodeoxyuridineのPBS溶液 250μL（2μCi）を尾静注により全個体に投与する。

5 時間後に、マウスを安楽死せしめ、両耳下リンパ節を摘出、PBS 中にプールする。リンパ節は投与群ごとに纏める（群ごとにデータを取る場合）か、もしくは個体ごとに纏める（個体ごとにデータを取る場合）。

2-2-4　細胞懸濁液の調製

プールされたリンパ節を 200μm 金属製メッシュ上で穏やかに押しつぶし、細胞懸濁液を調製する。充分量の PBS で 2 回洗浄したのち、5%Trichloroacetic acid（TCA）中で 4℃18 時間静置させ細胞を沈殿させる。細胞のペレットを 1ml の TCA に再懸濁させ、シンチレーションバイアルに移す。

2-2-5　放射性強度の測定

$^{3}$H-TdRを用いた場合、細胞懸濁液 1mlを 10 倍希釈してβ-シンチレーションカウンターにより、1 分当たりの崩壊数（Disintegrations per minute、DPM）を測定する。$^{3}$H-methyl thymidineの取り込みはDPM/投与群（群ごとにデータを取る場合）またはDPM/個体（個体ごとにデータを取る場合）で表される。$^{125}$IUを用いた場合は、細胞 1ml をそのまま用いてγ-カウンターにより同様に測定する。

2-2-6　動物の観察

実験に使用したマウスは、実験期間中注意深く観察し、投与部位の局所刺激性のみならず、毒性兆候の発現にも注意する。実験前後の体重変化も毒性発現の判断材料とする。観察結果は動物個体ごとに記録する。

2-2-7　試験結果の算出

群ごとの試験結果として SI 値を算出する。SI 値は、試験群の DPM の Vehicle 群の DPM に対する比とする（Vehicle 群の DMP を 1 とする）。個体ごとにデータを取った場合は、群ごとに平均および標準偏差を計算した後、平均値の比を SI 値とする。個体ごとにデータを取った場合は、適切な統計手法を用いて有意差の検定を行うことができる。外れ値を示す個体があり得る事に注意すべきであり、その場合、平均値をの代わりにメジアンを用いるまたは外れ値を示した個体を除くなどの対処を行う。

2-2-8　試験結果の評価

試験した用量の何れかで SI 値が 3 以上となった場合、その被験物質を皮膚感作性物質と判断する。ただし、SI 値を唯一の判断材料とするべきではなく、有意差検定の結果、用量依存性の有無、被験物質の毒性、被験物質の安定性、溶媒対照および陽性対照が妥当な値であるかどうか、を充分に考慮して判定する。疑わしい結果である時は、構造活性および既知の毒性情報、用量設定の妥当性を考慮すべきである。

2-3　LLNA の感度、特異性、予測性、精度

ICCVAM による評価結果を引用する（表 2-1）(6)。

ICCVAM は、ヒトにおける感作性ハザードを判断する上で、guinea pig を用いる方法と同等の検出力を有すると結論付けている。

2-4　LLNA の再現性

I. Kimber らおよび S. E. Loveless らによる施設内および施設間のバリデーション結果が報告されている(16)(17)。G. F. Gerberick、I. Kimber、D. A. Basketter による提案を受け ICCVAM では、DNCB、HCA、Isoeugenol、Eugenol に関して、施設内および施設間の再現性は、充分に受け入れられるレベルであるとしている(4)(7)。

2-5　LLNA の適用範囲

推奨されている Vehicle を用いた溶液または懸濁液として、マウス耳介に投与可能なあらゆる物質が評価可能である。guinea pig を用いる方法は感作誘発期の皮膚反応を評価するため、着色したサンプルのなかには評価が困難なものもあるが、LLNA には適用可能である。

GPMT と比較すると検出感度がやや低いと言われており、弱い感作性物質および一部の金属が False negative となることが知られている。また、幾つかの強い刺激性物質は False positive となることが知られている。

参考文献


1. Kimber, I., J. A. Mitchell, A. C. Griffin. *Fd Chem. Toxicol.* (1986) **24**, 585-586.
2. Kimber, I., J. Hilton, C. Weisenberger. *Contact Dermatitis* (1989) **21**, 215-220.
3. Chamberlain, M. and D. A. Basketter. *Fd Chem. Toxicol.* (1996) **34**, 999-1002.
4. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), National Institutes of Environmental Health Sciences. *The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals /Compounds* (1999) NIH Publication No. 99-4494
5. Sailstad, D. M., D. Hattan, R. N. Hill, W. S. Stokes. *Reg. Toxicol. Phaemacol.*(2001) **34**, 249-257.
6. Dean, J. H., L. E. Twerdok, R. R. Tice, D. M. Sailstad, D. G. Hattan, W. S. Stokes. *Reg. Toxicol. Phaemacol.*(2001) **34**, 258-273.
7. Haneke, K. E., R. R. Tice, B. L. Carson, B. H. Margolin, W. S. Stokes. *Reg. Toxicol. Phaemacol.*(2001) **34**, 274-286.
8. Food and Drug Administration (FDA). *Guidance for Industry: Immunotoxicology Evaluation of Investigational New Drugs* (2002).
9. U. S. Environmental Protection Agency (EPA). *Health Effects Test Guidelines* (2003), OPPTS 870.2600, Skin Sensitization.
10. OECD *OECD Guideline for the testing of Chemicals* (2002) Guideline 429, Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay.
11. Takeyoshi, M., M. Sawaki, K. Yamasaki, I. Kimber. *Toxicology* (2003) **191**, 259-263.
12. Hatao, M., T. Hariya, Y. Katsumura, S. Kato. *Toxicology* (1995) **98**, 15-22.
13. Suda, A., M. Yamashita, M. Tabei, K. Taguchi, H. W. Vohr, N. Tsutsui, R. Suzuki, K. Kikuchi, K. Sakaguchi, K. Mochizuki, K. Nakamura. *J. Toxicol. Sci.* (2002) **27**, 205-218.
14. Basketter, D. A., L. Blaikie, R. J. Dearman, I. Kimber, C. A. Ryan, G. F. Gerberick, P. Harvey, P. Evans, I. R. White, R. J. G. Rycroft. *Contact Dermatitis* (2000) **42**, 344-348.
15. ICCVAM Immunotoxicology Working Group, ICCVAM Peer Review Panel Evaluating the LLNA. *ICCVAM IWG LLNA Protocol* (2001) Protocol: Murine Local Lymph Node Assay (LLNA).

16. Kimber, I., J. Hilton, R. J. Dearman, G. F. Gerberick, C. A. Ryan, D. A. Basketter, E. W. Scholes, G. S. Ladics, S. E. Loveless, R. V. House, A. Guy. *Toxicology* (1995) **103**, 63-73.

17. Loveless, S. E., G. S. Ladics, G. F. Gerberick, C. A. Ryan, D. A. Basketter, E. W. Scholes, R. V. House, J. Hilton, R. J. Dearman, I. Kimber. *Toxicology* (1996) **108**, 141-152.

表2-1 Guinea pig およびヒトの感作性データとの比較におけるLLNAの検出力

J. H. Dean, *et al*., *Reg. Toxicol. Pharmacol*., **34**, 258-273.より引用。

(TABLE 2 Performance of the LLNA Compared to Guinea Pig and Human Sensitization Data-Total Database)

| Comparisons | Number of Comparison | Sensitivity | | Specificity | | Positive Predictivity | | Negative Predictivity | | Accuracy | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | % | No. | % | No. | % | No. | % | No. | % | No. |
| LLNA vs GPMT/BA | 97 | 91 | (62/68) | 83 | (24/29) | 93 | (62/67) | 80 | (24/30) | 89 | (86/97) |
| LLNA vs GPT | 126 | 87 | (81/93) | 82 | (27/33) | 93 | (81/87) | 69 | (27/39) | 86 | (108/126) |
| LLNA vs HUMAN | 74 | 72 | (49/68) | 67 | (4/6) | 96 | (49/51) | 17 | (4/23) | 72 | (53/74) |
| GPMT/BA vs HUMAN | 57 | 70 | (38/54) | 100 | (3/3) | 100 | (38/38) | 16 | (3/19) | 72 | (41/57) |
| GPT vs HUMAN | 62 | 71 | (42/59) | 100 | (3/3) | 100 | (42/42) | 15 | (3/20) | 73 | (45/62) |

LLNA; local lymph node assay, GPMT; guinea pig maximiztion test, BA; Buehler assay, GPT includes nonstandard guinea pig tests, HUMAN; human maximization test (HMT) plus human patch test allergen (HPTA).

## 資料３）LLNA-DA の原理　―代替法の原理に関する資料

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）が表皮の蛋白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、蛋白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、ランゲルハンス細胞は活性化して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 リンパ球は活性化し、その抗原を認識する特異的な T リンパ球の増殖がおこる。

LLNAでは、マウス耳介から吸収されたハプテンによる抗原特異的Tリンパ球の耳下リンパ節における増殖を、放射性元素（RI）で標識した核酸成分（以下、$^{3}$H-TdR）の取り込みを指標として検出する。

今回我々が提案するLLNAの代替法、LLNA-DAのコンセプトは、リンパ球増殖を検出する指標（エンドポイント）を変更する事であり、増殖後の細胞数を指標として検出しようとするものである。従って、ハプテンがマウス耳介より経皮的に吸収されることにより所属リンパ節のTリンパ球増殖に至る過程はLLNAと原理的に同じである。LLNAにおける$^{3}$H-TdRの取り込み量は、DNAの複製量およびその後に増殖する細胞数と直接的に相関すると考えられる。従って、LLNAで陽性となる感作性物質は、所属リンパ節の細胞数を測定する事によっても検出は可能であると予想される。

LLNA では、溶媒対照群との比較により SI 値が 3 を超えるものを感作性物質としている。検出の指標を変更すると、SI 値が一致するとは限らない。SI 値が一致しない場合は、３という閾値を変更しなければ LLNA と同等の検出感度は得られないと予測される。特に SI 値が低下する場合は、LLNA でようやく検出されている感作性物質は検出できない可能性がある。実際に、非 RI のエンドポイントをもつ改変法では、原法に対して SI 値が低くなっているものが多く見受けられる。LLNA は GPMT と比較して検出感度がやや劣るとされており、指標変更による SI 値の低下は False negative の増加を招くと考えられる。

そこで、LLNA-DAではSI値を高め、特にSI=3 を示す感作性物質濃度が原法と一致するように投与操作および日程に幾つかの変更を加えた。また簡便に細胞数を測定する指標として、ルシフェリン-ルシフェラーゼ法（L-L法）によるATPの測定を採用した。その結果、ATP発光量を指標としたSI値は、SI=3 付近で原法とよく一致し、従って$EC_3$もほぼ同等の値が得られることが分かった。このことにより、LLNA-DAはLLNAと同等の検出感度を有するものと期待できる。

LLNA-DA 法の変更点は以下の点である。

1) Day1～Day3 の連続投与の後、Day7（または Day6）に 4 回目の投与を追加する。
2) 各投与の 1 時間前に、1%SDS による前処理を行う。
3) 4 回目投与の 24 時間後にリンパ節を摘出し、細胞懸濁液の ATP 含量を L-L 法により測定し、その発光量をエンドポイントとする。

1)および 2)は SI 値を高める事が目的である。3)は簡便であり SI=3 付近で原法とよく一致することから採用した。以下に変更点および検出感度一致の原理について実験結果を基に記述する。

### 3-1　Day 7 投与の効果

Eugenol の 10%AOO 溶液、DNCB の 0.25%AOO 溶液を用いて、4 回目の投与による効果を確認した（図 3-1）。検体および被験物質を 3 日間連続で耳介に投与した後、Day 7、Day 8 におけるリンパ節重量と、Day 7 に 4 回目の投与を行いその 24 時間後（Day8）におけるリンパ節重量を比較した。示した値は並行して行った AOO 投与群に対する SI 値である。Day 7、Day 8 では共に 3 日連続投与によるリンパ節重量の増加が認められるが、両者の間に明確な差はない。これに対し、Day 7 に 4 回目の投与を行うと Day8 における SI 値は飛躍的に向上する。

Day6 に 4 回目の投与を行う事によっても同様の効果が得られることが確認されている。

### 3-2　SDS 前処理による効果

Sodium lauryl sulfate（SDS）は刺激性物質であり、高濃度の SDS は LLNA で偽陽性となる事が知られている(1)。さらに SDS は 1%の用量では有意な増加は示さないが、これを前処理に用いる事で、感作性物質の SI 値を向上させる効果があることが報告されている(2)(3)。

Eugenol の 10%AOO 溶液を用いて、SDS 前処理の効果を検討したところ、リンパ節重量の平均値、その SI 値とも約 1.3 倍に向上することが確認された（表 3-1、図 3-2）。AOO 投与群では SDS 前処理による変化はごく僅かな増加にとどまった。

SDS はランゲルハンス細胞の遊走を亢進すると言われており、この効果によって SI 値が向上している可能性がある(4)(5)。また、SDS の界面活性作用による耳介表面の浸透性向上、油成分の除去などの効果が期待できる。

### 3-3　エンドポイントとしての ATP 発光量および検出感度の一致

#### 3-3-1　L-L 法による ATP 測定原理と細胞数測定への利用

ルシフェリン-ルシフェラーゼ法（L-L 法）はホタルの生物発光原理を応用した ATP 量の測定方法である。ホタルルシフェラーゼは以下の反応により光を生じる。

$$\text{ATP}+\text{D-ルシフェリン}+O_2 \xrightarrow[Mg^{2+}]{\text{ルシフェラーゼ}} \text{AMP}+\text{ピロリン酸}+\text{オキシルシフェリン}+CO_2+\text{光}$$

酵素反応により生じる光の量は ATP 量に比例するため、発光量を測定する事により ATP を定量できる。L-L 法における ATP 量と発光量との相関については、直線性が確認されている(6)。

細胞懸濁液を界面活性剤で処理し、遊離した ATP を L-L 法により測定する事により細胞数を求める手法は、主に微生物の生菌数測定や清浄度管理の目的に利用されている。均一な細胞懸濁液では ATP 量と細胞数とに良好な直線性があり、ダイナミックレンジが広い。測定は非常に簡便で、1 サンプルあたり約 5 分で測定できる。試薬キットも数社から販売されている。

リンパ球数の指標として利用している報告もある(7)。

### 3-3-2　エンドポイントの比較

Isoeugenol/AOO（2.5%～50%）、10%Eugenol/AOO（陽性対照）、AOO（Vehicle）について LLNA-DA を実施し、更にその中で調製した組織懸濁液を計数板で測定して個体ごとのリンパ球数（cell number/animal）を求めた。リンパ節重量、ATP 発光量、細胞数について投与群ごとに SI 値を求め、３つのエンドポイントを比較した（図 3-3）。

すべての投与群および陽性対照群で、SI値は、リンパ節重量＜ATP発光量＜細胞数となった。それぞれのSI値より$EC_3$を算出すると、リンパ節重量で 8.02%、ATP発光量で 2.28%、細胞数で 0.31%であった。IsoeugenolのLLNAによる$EC_3$は 1.3～3.3%と報告されている(1)(8)。従って、Isoeugenolの場合LLNAと$EC_3$が最もよく一致するエンドポイントはATP発光量である（図 3-4）。リンパ節重量ではSI値が低すぎるために、細胞数はSI値が高すぎるためにLLNAと$EC_3$が一致せず、従ってリンパ節重量ではFalse negativeが増加し、細胞数ではFalse positiveが増加すると予想される。

リンパ節重量は感度が充分とは言えないが、細胞増殖の指標としては最も簡便に測定できる。細胞数は SI 値が高すぎる事に加え、全ての動物個体について計測する事は作業負荷がかなり高く、これを毎回の試験で実施することは実用性に乏しい。これに対し ATP 発光量は感度が LLNA に近いのみならず、測定が簡便かつ迅速であるという大きなメリットがある。試薬・測定装置が比較的安価であることから実用性も高い。

これらの事から、LLNA-DA では ATP 発光量をエンドポイントとする事とした。リンパ節重量は簡便に測定できるので、同時に実施し、試験判定の判断材料とする。

### 3-3-3　ATP 発光量、リンパ節重量の細胞数との相関

細胞数に対するATP発光量、リンパ節重量をそれぞれ個体ごとにプロットした(図3-5)。図では同時に検討した MBT（2-Mercaptobenzothiazol）のデータも合わせて表示した。なお、MBT のデータは BALB/ c マウスを用いて行った結果である。ATP 発光量、リンパ節重量ともに細胞数と直線の相関があることが確認された。

この結果は、細胞数の増加に寄与している細胞においては、個々に含まれる ATP 量がほぼ一定であり、それは増殖の程度によらない事を示唆している。これらの大部分はリンパ球であると考えられ、ATP 含量においてほぼ均一な細胞集団になっていることが示された。

これらの事から、ATP 発光量およびリンパ節重量を LLNA-DA における細胞数の指標として用いることに問題はないといえる。

3-3-4　エンドポイントにより SI 値が異なる理由

リンパ節重量はリンパ球の増殖を間接的に表現するが、摘出されたリンパ節の重量にはリンパ球以外の組織やリンパ液等も含まれている。また、ATP の測定値にもリンパ球以外の組織に由来する ATP よる発光も一部含まれると考えられる。(LLNA-DA のプロトコール、細胞懸濁液調製法参照)。これに対し、細胞数のデータにはリンパ球以外の要素は含まれない（リンパ球以外の細胞で、形態が類似しているためカウントされてしまう細胞はあり得るが、その比率は極めて低いと予想されるためここでは考えないものとする)。図 3-5 のグラフが直線であるということは、感作性物質によって主に増加するのはリンパ球であって、その他の組織やリンパ液等ではない事を示唆している。図 3-6（LLNA-DA 法）に Vehicle 投与群と感作性物質投与群のリンパ節の状態を模式的に示した。主に増加するのがリンパ球であるならば、リンパ球以外の要素が含まれるほど SI 値は低くなる。これが、リンパ節重量＜ATP 発光量＜細胞数となった理由であると考えられる。

3-3-5　$EC_3$一致の原理

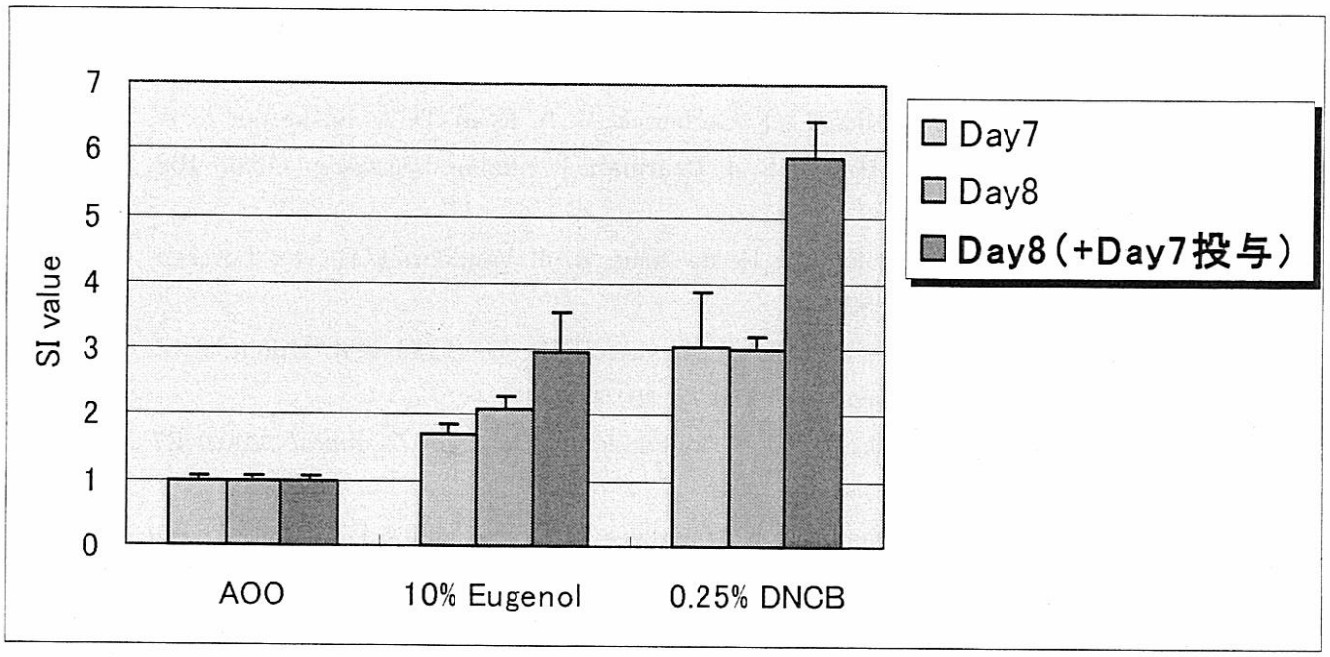
図 3-6 は、用いた感作性物質の用量がLLNAでSI=3 になる濃度（即ちLLNAでの$EC_3$）である場合の概念図である。LLNAは、$^3$H-TdRの取り込みがエンドポイントであるため、上記と同様の理由から細胞数よりも更に高いSI値を与えるはずである。しかしながら、LLNA-DAでは 4 回目の投与およびSDSの前処理を行っているため、同じ用量であってもリンパ球数はLLNAを上回っていると考えられる。これによってSI値が向上し、細胞数ではLLNAを上回り、ATPではLLNAと同等の値を得ることが出来ると考えられる。

この関係が成り立つのは、感作性物質の用量が$EC_3$の場合であって、リンパ球の増加には物理的および生物学的な限界があるため、例えばより高用量ではLLNAの方がより高いSI値を示すと予想される。

しかしながら、LLNA でSI=3 となる用量において、LLNA-DAでのリンパ節の状態が感作性物質によらず同じであると仮定するならば、ATPを指標としたLLNA-DAの$EC_3$はあらゆる被験物質でLLNAと一致すると考えられる。また、LLNAの判定の閾値はSI=3 であるから、LLNA-DAの検出感度がLLNAとほぼ同等となることが期待できる。

参考文献


1. Loveless, S. E., G. S. Ladics, G. F. Gerberick, C. A. Ryan, D. A. Basketter, E. W. Scholes, R. V. House, J. Hilton, R. J. Dearman, I. Kimber. *Toxicology* (1996) **108**, 141-152.
2. van Och, F. M. M., W. Slob, W. H. de Jong, R. J. Vandebriel, H. van Loveren. *Toxicology* (2000) **146**, 49-59.
3. Cumberbatch, M., R. C. Scott, D. A. Basketter, E. W. Scholes, J. Hilton, R. J. Dearman, I. Kimber. *Toxicology* (1993) **77**, 181-191.
4. Smith, H. R., D. A. Basketter, J. P. McFadden. *Clin. Exp. Dermatol.* (2002) **27**, 138-146.
5. Cumberbatch, M., R. J. Dearman, R. W. Groves, C. Antonopoulos, I. Kimber. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2002) **182**, 126-135.
6. Sakakibara, T., S. Murakami, N. Hattori, M. Nakajima, K. Imai. *Analytical Biochemistry* (1997) **250**, 157-161.
7. Ishizaka, A., T. Tono-oka, S. Matsumoto. *J. Immunol.Methods* (1984) **72**, 127-132.
8. Basketter, D. A., L. Blaikie, R. J. Dearman, I. Kimber, C. A. Ryan, G. F. Gerberick, P. Harvey, P. Evans, I. R. White, R. J. G. Rycroft. *Contact Dermatitis* (2000) **42**, 344-348.




Data presented as mean ± S. D.
AOO ; Acetone/Olive oil (4:1, v/v)
DNCB ; 2,4-Dinitrochlorobenzene

**図3-1　4回目投与によるSI値の向上**　リンパ節重量のSI値を、並行して行ったAOO群の値を1として比較した。Day1からDay3まで3日間連続投与を行った後、□;Day7のリンパ節重量のSI値、□;Day8のリンパ節重量のSI値、■;Day7に4回目の投与を行い、その24時間後（Day8）におけるリンパ節重量のSI値。

表 3-1 SDS前処理の効果 リンパ節重量の群平均を比較した。

| Test material | SDS pretreatment | Lymph Node Weight(mg) |
|---|---|---|
| AOO | + | 3.77 ± 0.60 |
| 10% Eugenol/AOO | + | 9.49 ± 2.48 |
| AOO | − | 3.65 ± 0.19 |
| 10% Eugenol/AOO | − | 7.13 ± 1.10 |

Data presented as mean±S. D.
AOO; Acetone/Olive oil (4:1, v/v)

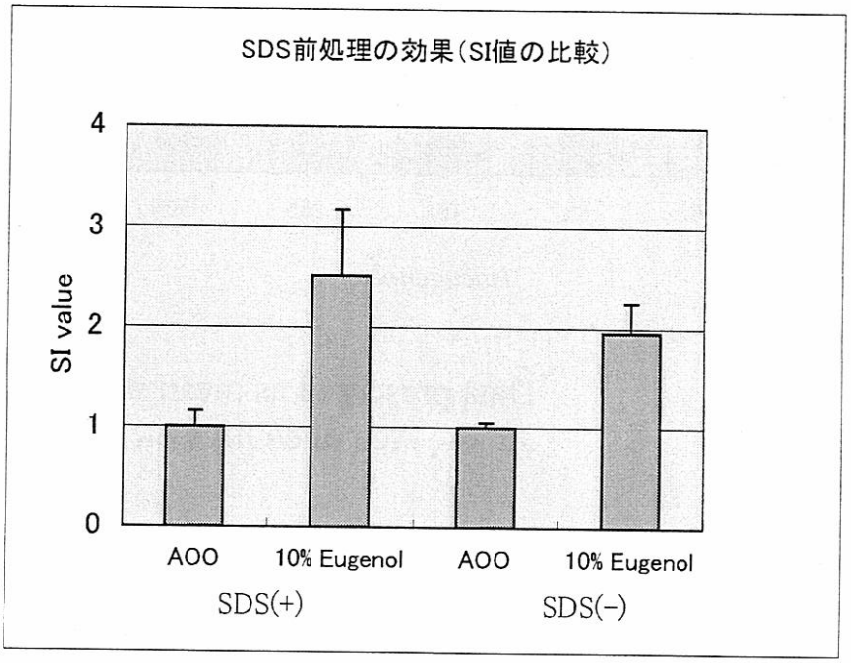
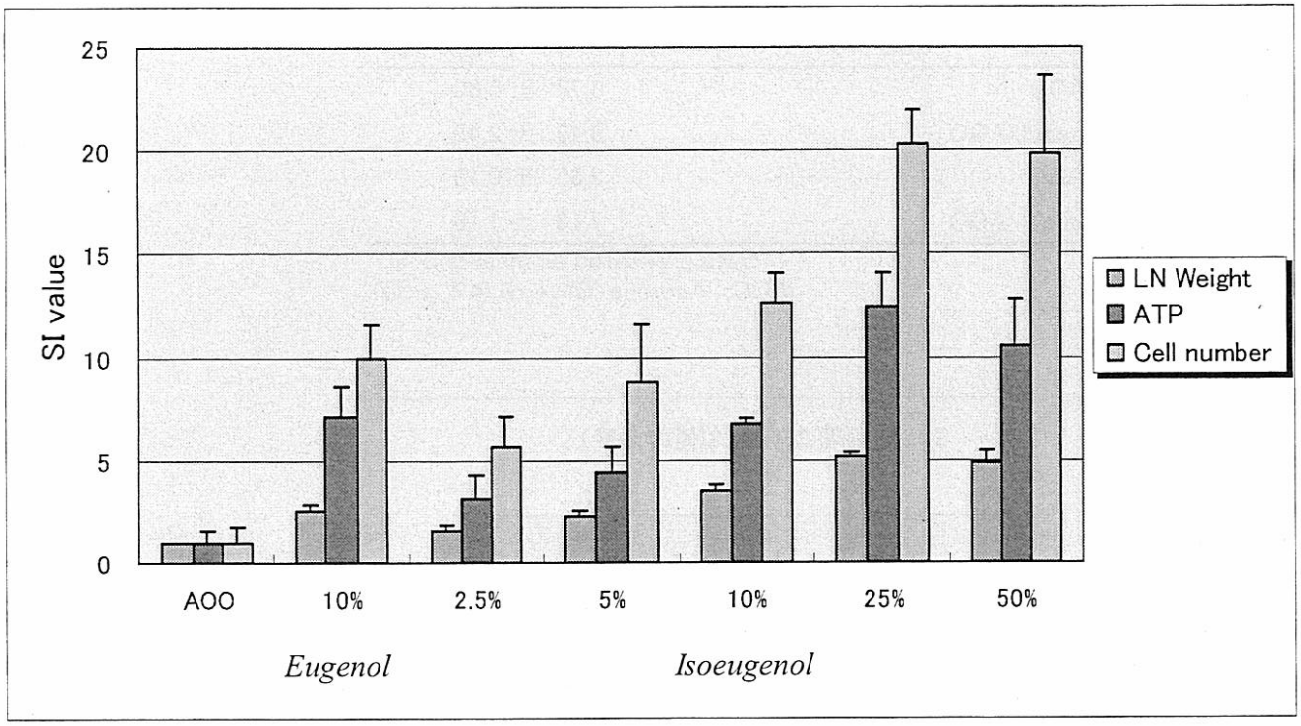
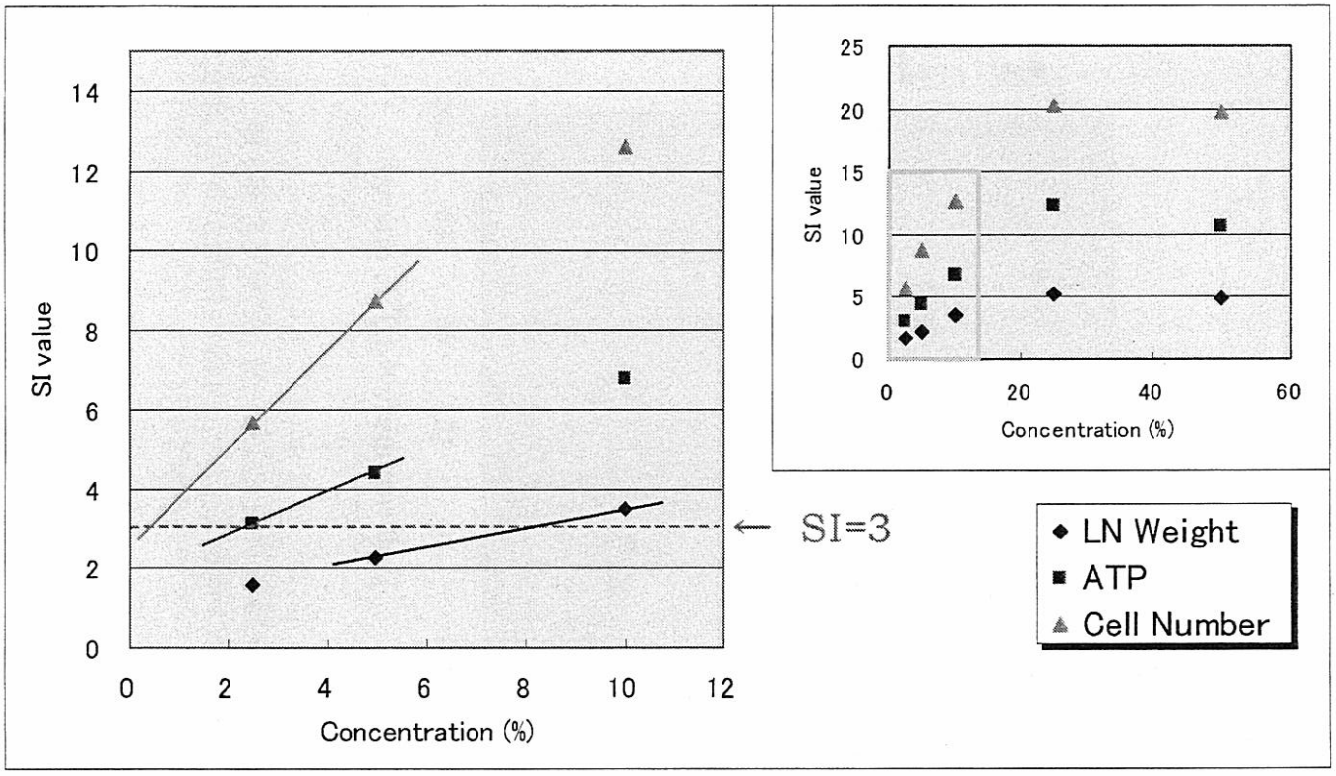



図3-2 SDS前処理の追加によるSI値の増加 リンパ節重量のSI値を、並行して行ったAOO群の値を1として比較した。




Data presented as mean ± S. D.
AOO ; Acetone/Olive oil (4:1, v/v)

**図3-3　検出方法によるSI値の差異**　3種類のエンドポイントによるSI値を比較した。値はリンパ節重量、ATP発光量、細胞数を個体ごとに測定し、AOO群を1とした各投与群のSI値を示している。
　すべての試験群でSI値はリンパ節重量＜ATP発光量＜細胞数となった。




EC3 = 8.02%　(LN Weight)
EC3 = 2.28%　(ATP)
EC3 = 0.31%　(Cell Number)

EC3 = 1.3～3.3%
(LLNA文献値[1)8)])

**図3-4　IsoeugenolにおけるEC$_3$の比較**　Isoeugenolについて3種類のエンドポイントによるSI値を用量に対してプロットした。図に示した2点よりEC$_3$をそれぞれ求めた。ATP発光量をエンドポイントとしたとき、LLNAの文献値と最も一致する。

1)　Loveless, S. E., *et al.*, *Toxicol.* (1996) **108**, 141-152.
8)　Basketter, D. A., *et al.*, *Contact Dermatitis* (2000) **42**, 344-348.

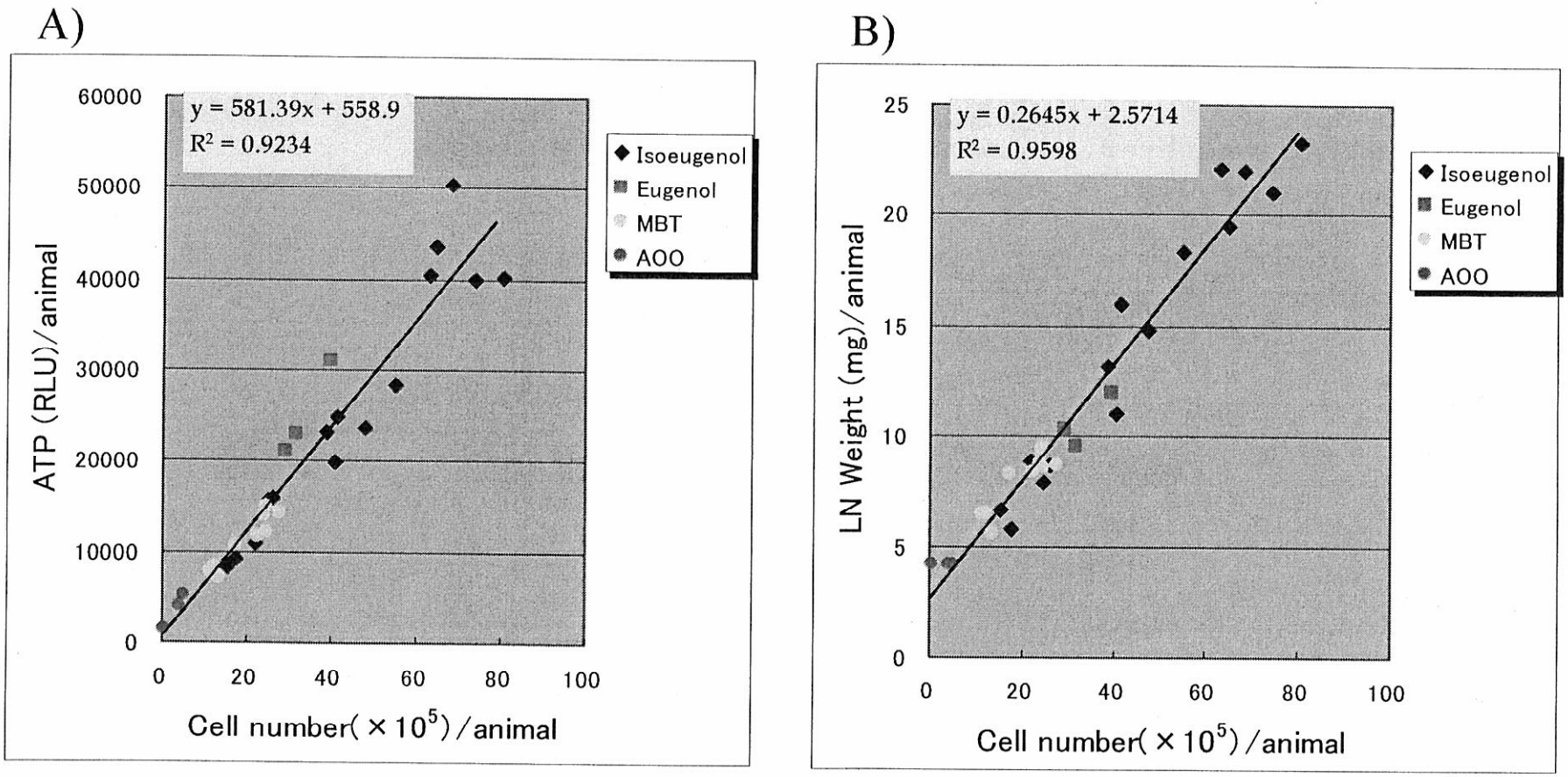



**図3-5 リンパ節重量・ATP発光量と細胞数との相関** 異なる検体・用量の被験物質による A) ATP発光量、B) リンパ節重量の値を細胞数に対し個体ごとにプロットした。ATP発光量、リンパ節重量は細胞数に対し直線の相関がある。細胞数の増加に関与している細胞あたりのATP量・重量は、感作の強度によらずほぼ一定である事を示している。

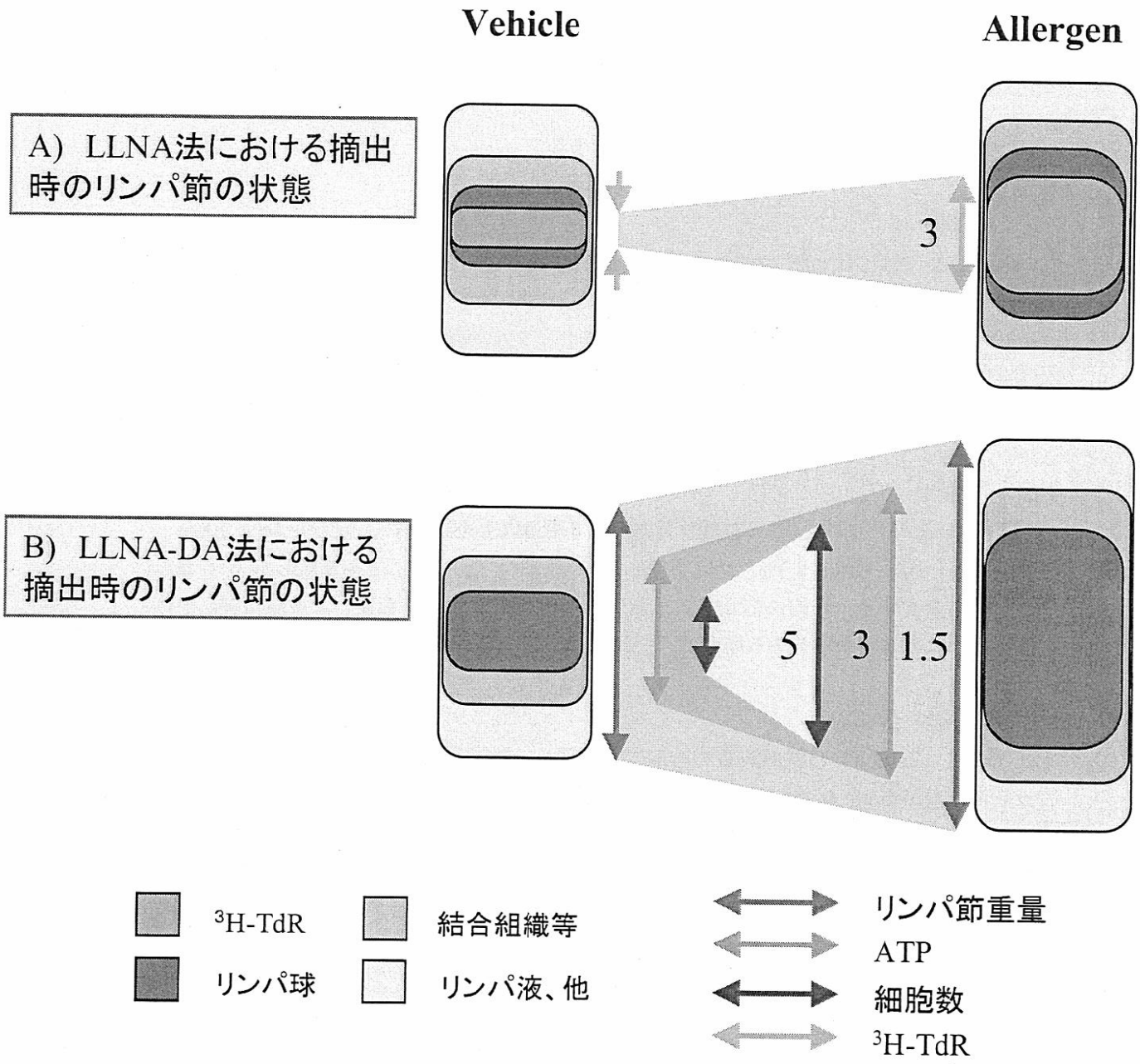



**図3-6 LLNA、LLNA-DAにおけるリンパ節の概念図：SI値の比較および$EC_3$一致の原理**

A) LLNAにおけるVehicle投与群と感作性物質投与群（Allergen）の摘出時（Day6）のリンパ節の状態を示した。感作性物質の用量は$EC_3$の濃度であるとする。このとき$^3$H-TdR取り込み量のSI値は3である。

B) LLNA-DAにおける摘出時（Day8）のリンパ節の状態を示した。A)と同じVehicle、Allergenを使用したとする（Allergenの用量はLLNAの$EC_3$）。

試験の条件が同じであれば、SI値は$^3$H-TdR＞細胞数＞ATP＞リンパ節重量となるはずである。LLNA-DAでは試験法の違いからリンパ球数がLLNAを上回っていると考えられ、このためSI値が向上し、ATP発光量でLLNAとほぼ同等の値となる。LLNAでSI=3となる用量におけるLLNA-DAでのリンパ節の状態が感作性物質によらず同じであると仮定すれば、ATPを指標としたLLNA-DAの$EC_3$はあらゆる被験物質でLLNAと一致すると考えられる。

## 資料4） LLNA-DA のプロトコール —試験法の詳細なプロトコール

LLNA-DA 試験のプロトコールを以下に記述する。

### 4-1 使用動物

LLNA-DA には CBA/JN マウスの出産および妊娠経歴のない雌で、試験開始時に 8~12 週齢のものを使用する。入荷時に体重測定を実施し、異常が認められる動物は使用しない。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。5 日以上の馴化の後、皮膚に異常が認められない動物を試験に供する。

### 4-2 用量設定

1群3匹以上のマウスを用い、被験物質あたり3用量以上を設定する。投与用量は、100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%・・の系列から、少なくとも連続した 3 用量以上を含むものとする。目的に応じて、上記以外の用量を追加しても良い。被験物質に急性毒性あるいは皮膚刺激性がある場合は、それを考慮して最高用量を設定する。

### 4-3 使用溶媒（Vehicle）

使用溶媒（Vehicle）は被験物質の溶解性を考慮し、溶液または懸濁液として最も高濃度で投与可能な Vehicle を選択する。Vehicle の優先順位は、Acetone/olive oil（4:1 v/v、AOO）、Dimethylformamide（DMF）、Methyl ethyl ketone（MEK）、Propylene glycol（PG）、Dimethyl sulfoxide（DMSO）である。その他の Vehicle も充分な科学的根拠があれば使用可能である。マウス耳介に広がりにくくかつ乾きにくい Vehicle ほど、投与量が不正確になる恐れがあるため、避けるのが望ましい。

### 4-4 陰性対照および陽性対照

陰性対照群として、試験に使用した Vehicle の投与群を設ける。

試験の信頼性を確保するため、陽性対照群を設ける。陽性対照物質は、LLNA-DA において陽性反応が得られることが確認されている物質を用い、ATP を指標とした SI 値が 3 を超えると予想される濃度で使用する。陽性対照は、試験に使用した Vehicle を用いて設定することが望ましいが、当該 Vehicle において陽性反応が得られることが確認された物質がない場合は、他の Vehicle を用いた陽性対照群を設定することとする。

例として Eugenol（CAS No: 97-53-0）の 10%AOO 溶液、Hexyl cinnamic aldehyde（HCA、CAS No: 101-86-0）の 15%AOO 溶液が陽性対照として使用できる。

陰性対照群および陽性対照群は試験群と同じ操作を並行して行う。

4-5　SDS 水溶液の調製

Sodium lauryl sulfate（SDS、CAS No:151-21-3）を秤量後、蒸留水（D. W.）を添加する。蒸留水添加量は、SDS 0.1000g あたり 10.00ml とする。これを溶解させ 1%SDS 水溶液とする。

調製した 1%SDS 水溶液は、15ml 容チューブに約 3ml ずつ分注し、設定した投与群ごとに使用する。15ml 容チューブには使用する投与群を明示しておく。

4-6　試験液および陽性対照物質溶液の調製

被験物質は適切な Vehicle を用いて溶液または懸濁液とし、試験液とする。

被験物質が液体の場合、原則として v/v%で目的の濃度に調製する。被験物質が固体の場合もしくは粘性が高い液体で正確な定容が困難な場合は、w/v%で目的の濃度に調製する。

Vehicle 添加後、よく攪拌し溶解または懸濁液とする。懸濁液の場合は投与操作の直前にも充分な攪拌が必要である。投与が困難な場合は、被験物質の前処理（粉砕）および後処理（加温、超音波処理、ポリトロン処理）を行う。

調製後の高用量試験液が溶液である場合に限り、より低用量の試験液は、高用量試験液の一部を使用溶媒で希釈して調製しても良い。希釈は v/v で行う。

陽性対照物質溶液の調製も同様とする。

調製は 15ml 容チューブまたは 50ml 容チューブを用いて行う。

4-7　投与日程

・ Day 1 ：

エーテル麻酔下、1%SDS 水溶液をマウスの両耳介背面に筆を用いて適量を塗布する。操作は投与群ごとに連続して行う。

1%SDS 水溶液塗布の 1 時間後、各濃度に調製した被験物質溶液または懸濁液、および Vehicle、陽性対照物質溶液を、マウスの両耳介背面に滴下し開放曝露させる。滴下量は、耳介あたり 25μL（50μL/animal）とする。

・ Day 2 、Day 3 ：

Day 1 と同じ操作を行う。1%SDS 水溶液塗布時に、前日に投与した被験物質がマウス耳介に残留している事を考慮すべきである。SDS 水溶液へのコンタミを避けるため、一投与群終了ごとに筆の交換または充分な水洗を行う。

・ Day 7 （または Day 6 ）：

Day 2 、Day 3 と同じ操作を行う。

・ Day 8 （または Day 7 ）

マウスの体重を個別に測定する。

前日の滴下曝露の 24 時間後から 30 時間後の間に、マウスを安楽死せしめ、両耳下リンパ節の摘出およびリンパ節重量の測定、細胞懸濁液の調製、ATP 発光量の測定を行

う。

4-8　リンパ節の摘出および重量測定

マウスをエーテル麻酔により安楽死せしめ、直ちに両耳下リンパ節を摘出する。摘出するリンパ節は、LLNA のプロトコールに記載された図に従う(1)。摘出したリンパ節は個体ごとにシャーレに纏め、電子天秤で直ちに湿重量を測定する。

4-9　細胞懸濁液の調製

個体ごとのリンパ節を 2 枚のスライドグラスにはさみ押しつぶし（図 4-1)、組織が薄く広がったのを確認したのち、引き離す。

両スライドグラス上の組織を 500μL の PBS に懸濁させる。スライドグラスを 1 枚ずつ、シャーレで受けながら PBS を掛け流しセルスクレーパーでスライドグラス上の組織を掻き取る、これを数回それぞれ繰り返す（図 4-2)。2 枚のスライドグラスに対し使用する PBS のトータル量を 500μL とする。

最後にシャーレの組織懸濁液をセルスクレーパーで軽く攪拌する。

シャーレに調製された組織懸濁液から、肉眼で確認できる膜組織を避けて 20μL を採取し、PBS 1.98ml に添加（100 倍希釈)、よく攪拌して細胞懸濁液とする。細胞懸濁液は個体ごとに 2 本ずつ作成する（系統 1 、系統 2)。

4-10　ATP 量の測定

ATP量の測定はLumiTech™ ViaLight™ HS BioAssay kitを用いて行う。

予め、ルミノメーター用チューブに「Nucleotide Releasing Reagent（NRR）」（ATP抽出試薬、界面活性剤）を 90μLずつ分注しておく。細胞懸濁液をよく攪拌後 90μLを採取し、ルミノメーター用チューブに添加しよく攪拌する。5 分間静置後、「ATP Monitoring Reagent（AMR）」（発光試薬、ルシフェリン・ルシフェラーゼ・$Mg^{2+}$溶液）20μLを添加し、すばやく攪拌後、直ちにルミノメーターで発光量（RLU）を測定する。ルミノメーター（キッコーマン社製、ルミテスターC-100）は 10 秒間の発光量を測定する。

AMR 添加後の発光量は、経時的かつ速やかに減少するため、AMR 添加からルミノメーターの測定ボタンを押すまでの操作は、出来るだけすばやく、かつ出来るだけ一定のリズムで行うことが大切である。

4-11　摘出から ATP 測定までの操作に関する注意事項

動物死亡後はリンパ節の ATP 含有量は経時的に減少する。従って、動物の安楽死から ATP 測定までの操作は速やかに実施し、少なくとも 20 分以内に完了させる。その所要時間は個体間で出来る限り一定である事が望まれる。

操作フローの例を図 4-3-1 および図 4-3-2 に示す。

4-12　動物の観察

実験に使用したマウスは、実験期間中注意深く観察し、投与部位の局所刺激性のみならず、毒性兆候の発現にも注意する。摘出当日の体重も毒性発現の判断材料とする。

4-13　試験結果の算出

リンパ節重量は測定値を個体のデータとする。ATP 量は、2 系統の発光量（RLU）の平均値を個体のデータとする。それぞれ投与群ごとに、個体データの平均値および標準偏差を算出する。

Vehicle 群の平均値に対する試験群の平均値の比を算出し、SI 値とする（Vehicle 群の平均値を 1 とする）。Vehicle 群と試験群の分散を $F$ 検定により確認した上で、スチューデントの $t$-test により有意差検定を行う。

外れ値を示す個体があり得る事に注意すべきであり、その場合、平均値の代わりにメジアンを用いるまたは外れ値を示した個体を除くなどの対処を行う。

4-14　試験結果の評価

試験した用量の何れかで ATP 量の SI 値が 3 以上となった場合、その被験物質を皮膚感作性物質と判断する。ただし、ATP 量の SI 値を唯一の判断材料とするべきではなく、有意差検定の結果、用量依存性の有無、被験物質の毒性、溶媒対照および陽性対照が妥当な値であるかどうか、を充分に考慮して判定する。リンパ節重量の情報および SI 値だけでなく個々の測定値も判断材料とする。疑わしい結果である時は、構造活性および既知の毒性情報、被験物質の安定性、用量設定の妥当性を考慮すべきである。

4-15　機器および器具、試薬

今回使用した実験機器および実験器具のリストを表 4-1 に、使用した試薬および溶媒のリストを表 4-2 に示す。ルミノメーター用チューブ、15ml 容チューブ、50ml 容チューブ、シャーレ、スライドグラスは、使い捨てとする。

参考文献

1. ICCVAM Immunotoxicology Working Group, ICCVAM Peer Review Panel Evaluating the LLNA. *ICCVAM IWG LLNA Protocol* (2001) Protocol: Murine Local Lymph Node Assay (LLNA).

表4-1 実験機器、実験器具リスト

| 機器・器具名 | メーカー | 商品名または品番 | 規格、その他 |
|---|---|---|---|
| ルミノメーター | キッコーマン株式会社 | LUMITESTER C-100 | 測定範囲：$4\times10^{-12}$～$1\times10^{-6}$M ATP<br>上限：1000000RLU |
| ルミノメーター用チューブ | キッコーマン株式会社 | ルミチューブ | 3.5ml、55×12mmφ、ポリプロピレン製、EOG滅菌済み |
| 15ml容チューブ | IWAKI | 遠沈管 | ポリプロピレン製、Non-pyrogenic、Sterile |
| 50ml容チューブ | IWAKI | 遠沈管 | ポリプロピレン製、Non-pyrogenic、Sterile |
| シャーレ | Corning Inc. | Cell Culture Dish | 35mm×10mm、Non-pyrogenic、Sterile |
| セルスクレーパー | Costar Corporation | Disposable cell scraper | Sterile |
| スライドグラス | MATSUNAMI GLASS IND., LTD. | MICRO SLIDE GLASS | 76×26mm、Thickness 0.9～1.2mm |
| ボルテックスミキサー | Scientific industries, Inc. | VORTEX-GENIE 2™ | |
| 電子天秤（試薬調製用） | METTLER | AJ 180 | 最小 0.0001g (0.1mg) |
| 電子天秤（リンパ節重量測定用） | METTLER | AE 240 | 最小 0.00001g (0.01mg) |
| 筆 | 一休園 | 和尚 | 細筆B、漢字用一般細字用 |

表4-2 試薬、溶剤リスト

| 試薬・溶剤名 | | 規格または品番 | CASRN | Source | Lot No. |
|---|---|---|---|---|---|
| SDS | Sodium lauryl sulfate | | 151-21-3 | Nacalai | M9N2571 |
| Acetone | Acetone | 試薬特級 | 67-64-1 | Kanto | 409A3105 |
| Olive oile | Olive oile | 日本薬局方 オリブ油 | - | 吉田製薬 | 001571 |
| DMSO | Dimethylsulfoxide, dehydrated | 有機合成用 | 67-68-5 | Wako | DWJ9513 |
| DMF | Dimethylformamide | 試薬特級 | 68-12-2 | Wako | V2P1219 |
| PBS | Phosphate Buffered Saline, 7.2 | Gibco™ 0.1 μm filterd | - | Invitrogen | 1157913, 3069857 |
| 発光試薬 | LumiTech™ ViaLight™ HS BioAssay kit | LT07-211 | - | BioWhittaker | TK0043, TK0027 |
| 蒸留水 | Destilled Water | 日本薬局方 注射用水 | - | 大塚製薬工場 | K3A85, K0J73 |

Nacalai: Nacalai Tesque, Inc. Kyoto, Japan. ナカライテスク株式会社
Kanto: KANTO CHEMICAL CO., INC. Tokyo, Japan. 関東化学株式会社
吉田製薬：吉田製薬株式会社
Wako: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 和光純薬工業株式会社
Invitrogen: Invitrogen Corporation
BioWhittaker: BioWhittaker Molecular Applications
大塚製薬工場：Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc. 株式会社大塚製薬工場

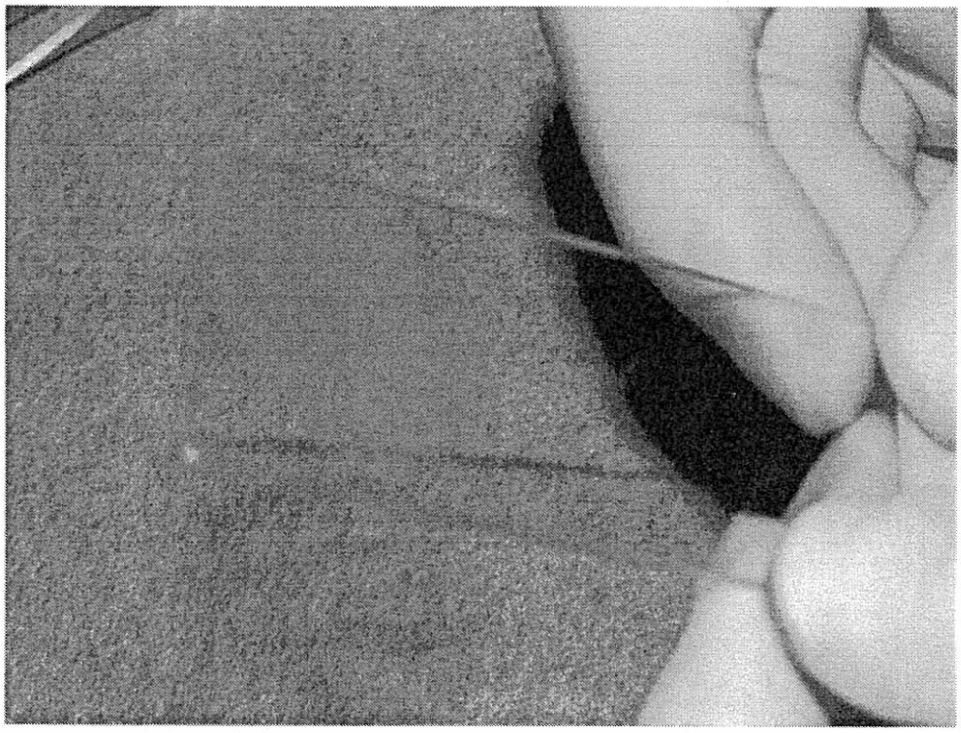


**図4-1　細胞懸濁液の調製(1)**　摘出したリンパ節を個体ごとに二枚のスライドグラスにはさみ押しつぶす。

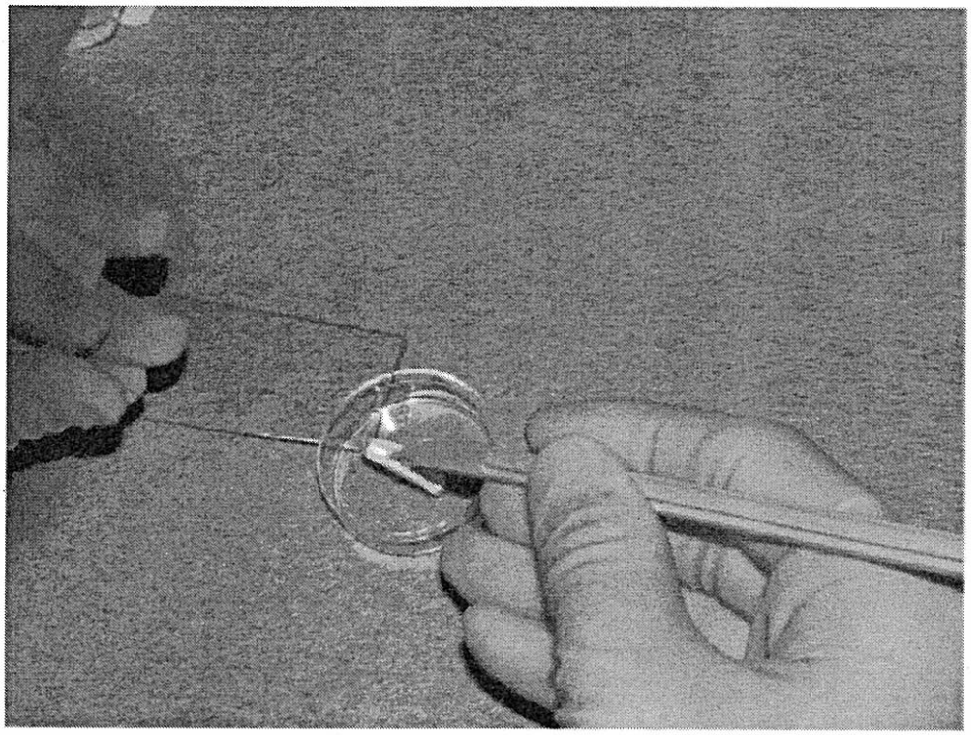


**図4-2　細胞懸濁液の調製(2)**　PBSを掛け流し、セルスクレーパーでスライドグラス上の組織を掻き取る。シャーレの液をすくいながら数回繰り返す。PBS量は個体ごとに500μLとする。

## 《一人の作業者で実施する場合》

**エーテル麻酔にて安楽死**

1個体のみ。

**両耳下リンパ節摘出**

摘出したリンパ節はシャーレに纏める。

**リンパ節重量測定**

電子天秤で重量測定

**細胞懸濁液調製**

リンパ節を二枚のスライドグラスで押しつぶし、500μLのPBSに懸濁させる。

肉眼で確認できる膜組織を避け、20μL採取し、PBS1.98mLに懸濁させ、よく攪拌する。

PBS1.98mlは予め個体あたり2本ずつ作成しておき、2系統の細胞懸濁液を調製する。

**ATP測定**

予めNRRを90μLずつルミノメータ－用チューブに分注しておく

系統1の細胞懸濁液をよく攪拌し、90μLを採取、NRR90μL中に添加、よく攪拌して静置する。

系統2の細胞懸濁液をよく攪拌し、90μLを採取、NRR90μL中に添加、よく攪拌して静置する。

系統1添加の5分後、AMR20μLを添加し、素早く攪拌後、ルミノメーターで10秒間のATP発光量を測定する。

系統2添加の5分後、AMR20μLを添加し、素早く攪拌後、ルミノメーターで10秒間のATP発光量を測定する。

| ATP測定タイムコース | |
|---|---|
| 0min | 系統1、NRRに添加 |
| 0.5min | 系統2、NRRに添加 |
| 5min | 系統1、AMR添加、測定 |
| 5.5min | 系統2、AMR添加、測定 |

**図4-3-1 操作フローの例1** 一人の作業者で行う場合は、個体ごとに安楽死からATP測定までの操作を連続して行う。

## 《複数の作業者で実施する場合》

a) エーテル麻酔にて安楽死 （作業者1）
　１投与群（3匹～4匹）、１群5匹以上場合は、２回に分ける。

b) 両耳下リンパ節摘出 （作業者2）
　摘出したリンパ節は個体ごとにシャーレに纏める。

c) リンパ節重量測定 （作業者1）
　電子天秤で個体ごとに重量測定。

d) 細胞懸濁液調製 （作業者3）
　個体ごとに細胞懸濁液を調製。2系統/動物。

e) ATP測定 （作業者4）
　予めNRRを90μLずつルミノメーター用チューブに分注しておく。
　細胞懸濁液が揃うタイミングを見計らって測定を開始する。

ATP測定タイムコース

| | |
|---|---|
| 0min | 動物1系統1、NRRに添加 |
| 0.5min | 動物1系統2、NRRに添加 |
| 1min | 動物2系統1、NRRに添加 |
| 1.5min | 動物2系統2、NRRに添加 |
| 2min | 動物3系統1、NRRに添加 |
| 2.5min | 動物3系統2、NRRに添加 |
| ・・・ | |
| 5min | 動物1系統1、AMR添加、測定 |
| 5.5min | 動物1系統2、AMR添加、測定 |
| 6min | 動物2系統1、AMR添加、測定 |
| 6.5min | 動物2系統2、AMR添加、測定 |
| 7min | 動物3系統1、AMR添加、測定 |
| 7.5min | 動物3系統2、AMR添加、測定 |
| ・・・ | |

**図4-3-2 操作フローの例2** 複数の作業者で分担して行う場合は群ごとに安楽死させてもよい。フローは4人の作業者で実施する例。a)とb)を一人の作業者で、 c)とd)を一人の作業者で行い、3人で行う事も可能。安楽死からATP測定終了までの所要時間は各個体20分以内になるようにする。

## 資料５）LLNA-DA で評価した被験物質リスト

—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

LLNA-DA で評価した被験物質は 17 検体であり、そのリストを表 5-1 に纏めた。

LLNA の試験結果との比較が可能となるように、LLNA での評価結果が報告されている物質の中から選択した。既報の LLNA の結果から、非常に強い感作性物質のカテゴリーに属するものとして、2,4-Dinitrochlorobenzene（DNCB）および *p*-Phenylenediamine（pPDA）を、比較的強い感作性物質のカテゴリーに属するものとしてCinnamic aldehydeおよびIsoeugenolを、中程度の感作性物質のカテゴリーに属するものとしてEugenolおよびAbietic acid、Hexylcinnamic aldehyde（HCA）、Citral、Benzocaineを選択した。弱い感作性物質または刺激性物質としてPropylparabenおよびMethyl salicylate、Benzalkonium chloride（BzC）を評価に加えた。Benzalkonium chloride は、LLNAでリンパ球増殖活性があることが報告されている。DMF溶媒系での試験が報告されている感作性物質の中から、Imidazolidinyl ureaおよび 2-Mercaptobenzothiazol（MBT）を、DMSO溶媒系での試験が報告されている感作性物質であり、金属塩である$CoCl_2$、$NiSO_4$を選択した。$NiSO_4$はLLNAでFalse negativeとなることが知られている。Trimellitic anhydride（TMA）は気道感作性として知られているが、LLNAでも陽性となる事が報告されている。

リストアップした被験物質について報告されている感作性試験の結果を表 5-2 に纏めた。

表5-1 被験物質リスト

| Chemical name | | CASRN | source | Lot No. |
|---|---|---|---|---|
| DNCB | 2,4-Dinitrochlorobenzene | 97-00-7 | Wako | KSN7104 |
| pPDA | 4-Phenylenediamine | 106-50-3 | Wako | TCE4801 |
| TMA, Trimellitic anhydride | 1,2,4-Benzenetricarboxylic anhydride | 552-30-7 | Wako | TCH3765 |
| Cinnamic aldehyde | 3-Phenyl-2-propenal | 104-55-2 | Wako | TCJ3382 |
| Isoeugenol | 2-methoxy-4-propenylphenol | 97-54-1 | Wako | ELM5079 |
| Eugenol | 4-allyl-2-methoxyphenol | 97-53-0 | Wako | TCM7002 |
| Benzocaine | Ethyl 4-aminobenzoate | 94-09-7 | Sigma-Aldrich | A7047 |
| Abietic acid | | 514-10-3 | Wako | LDQ0632 |
| HCA | Hexyl cinnamic aldehyde | 101-86-0 | Wako | SEN5254 |
| Citral | 3,7-Dimethyl-2,6-octadienal | 5392-40-5 | Wako | DWF1148 |
| Imidazolidinyl urea | 1,1'-Methylenebis[3-[3-(hydroxymethyl)-2,5-dioxo-4-imidazolidinyl]urea] | 39236-46-9 | ICN | 70169 |
| MBT | 2-Mercaptobenzothiazol | 149-30-4 | Aldrich | 10315HU |
| $CoCl_2$ | Cobalt (II) chloride | 7646-79-9 | Wako | WAG3407 |
| NiSO4 | Nickel (II) sulfate hexahydrate | 10101-97-0 | Wako | CKQ3174 |
| Propylparaben | Propyl 4-hydroxybenzoate | 94-13-3 | Wako | WAG1323 |
| Methyl salicylate | | 119-36-8 | Wako | TCF4726 |
| BzC | Benzalkonium chloride | 8001-54-5 | ICN | 3813F |

Wako: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 和光純薬工業株式会社
ICN: ICN Biomedicals Inc.
Sigma-Aldrich: Sigma Aldrich Japan. シグマアルドリッチジャパン株式会社
Aldrich: Aldrich Chemical Company, Inc.

表5-2 被験物質の感作性試験結果

| Chemical name | LLNA | GPMT/BA | HMT | HPTA | Reference |
|---|---|---|---|---|---|
| DNCB | + | + | | | 1) |
| pPDA | + | + | + | + | 1) |
| Trimellitic anhydride | + | + | | | 2) |
| Cinnamic aldehyde | + | + | + | + | 1) |
| Isoeugenol | + | + | | + | 1) |
| Eugenol | + | + | | + | 1) |
| Benzocaine | +/− | + | +/− | | 1) |
| Abietic acid | + | + | | + | 1) |
| HCA | + | + | | | 1) |
| Citral | + | + | + | | 1) |
| Imidazolidinyl urea | + | + | | + | 1) |
| MBT | + | + | + | + | 1) |
| $CoCl_2$ | + | + | + | + | 1) |
| $NiSO_4$ | − | + | + | + | 1) |
| Propyl paraben | − | − | +/− | + | 1) |
| Methyl salicylate | − | − | − | | 1) |
| Benzalkonium chloride | − | − | | + | 1) |

1) K. E. Haneke, *et al.*, *Reg. Toxicol. Pharmacol.* (2001) **34**, 274-286
2) D. A. Basketter, *et al.*, *Fd Chem. Toxicol.* (1992) **30**, 65-69

## 資料６）LLNA-DA 試験結果

—検討した被験物質の *in vivo* 及び *in vitro* 試験結果に関する資料

17 検体の LLNA-DA の評価結果を以下に記載する。試験した被験物質は既に LLNA での評価結果が報告されており、それと比較する目的もあるため、Vehicle および用量の設定は、既報の文献情報を基に行った。

6-6-2 を除く全ての試験は、本試験は Day 1 、Day2、Day3、Day7 に投与を行い、Day8 に摘出および測定を行った。6-6-2 のみ Day 1 、Day2、Day3、Day6 に投与を行い、Day7 に摘出および測定を行った。

判定結果の一覧は表 6-18 に纏め、LLNA、GPMT/BA、HMT、HPTAの文献データと対比させた。また、ATPのSI値を指標とした$EC_3$の一覧は表 6-19 に纏め、LLNA、GPMTの文献データと対比させた。

### 6-1　DNCB の試験結果

DNCB の LLNA-DA による評価結果を表 6-1 および図 6-1 に示す。

Vehicle は AOO（acetone/olive oil (4:1, v/v)）を用いた。

0.1%以上の用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。0.05%から 0.5%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

0.025%～0.05%では用量依存性は認められなかった。0.5%以上の用量では耳介での刺激性と見られる変化が観察された。

Vehicle 群の No.2 の動物の ATP 発光量は異常に高い値を示した。ATP の測定に不備があったものと考えられるため、データから省いた。

DNCB の判定結果は陽性である。

$EC_3$＝0.05%　（0.05%および 0.1%の 2 用量群のATPを指標とするSI値より求めた）。

### 6-2　pPDA の試験結果

pPDA の LLNA-DA による評価結果を表 6-2 および図 6-2 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

15%用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。0.05%から 15%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

pPDA の判定は陽性である。

$EC_3$＝0.35%　（0.25%および 15%の 2 用量群のATPを指標とするSI値より求めた）。

### 6-3　TMA の試験結果

TMA の LLNA-DA による評価結果を表 6-3 および図 6-3 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

用量設定をプロトコールに規定する以前に実施した結果であるため、用量設定がプロトコールとは異なる。

1.5%以上の用量でATP量を指標としたSI値が3を超えた。0.15%から15%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

用量設定に問題があるが、TMAの判定が陽性であることは明らかである。

$EC_3$=0.20%　(0.15%および1.5%の2用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。

6-4　Cinnamic aldehydeの試験結果

Cinnamic aldehydeのLLNA-DAによる評価結果を表6-4および図6-4に示す。

VehicleはAOOを用いた。

5%以上の用量でATP量を指標としたSI値が3を超えた。1%から15%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

Cinnamic aldehydeの判定は陽性である。

$EC_3$=2.98%　(2.5%および5%の2用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。

6-5　Isoeugenolの試験結果

IsoeugenolについてLLNA-DAにより独立した3回の評価を行った。

6-5-1

Isoeugenol Exp. 1の評価結果を表6-5-1および図6-5-1に示す。

VehicleはAOOを用いた。

5%以上の用量でATP量を指標としたSI値が3を超えた。0.5%から25%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

25%～50%では用量依存性は認められなかった。

Vehicle群のNo.2の動物のATP発光量は異常に高い値を示した。ATPの測定に不備があったものと考えられるため、データから省いた。

25%および50%投与群のATP発光量は非常に高い値を示している。Exp. 2と比較するとリンパ節重量の値はほぼ再現性があるのに対し、ATP発光量ではばらつきが大きい。この用量域ではリンパ節重量が20mg前後に達し、組織の懸濁に用いるPBSの量が500μLであるため懸濁液の濃度は非常に高いと考えられる。そのことがATP測定の精度を下げている要因と思われる。

Isoeugenolの判定は陽性である。

$EC_3$=3.40%　(2.5%および5%の2用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。

6-5-2

Isoeugenol Exp. 2の評価結果を表6-5-2および図6-5-2に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

2.5%以上の用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。2.5%から 25%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

25%～50%では用量依存性は認められなかった。

Isoeugenol の判定は陽性である。

$EC_3$=2.28%　(2.5%および 5%の 2 用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。最低用量の 2.5%投与群でSI値が 3 を超えたため、SI値が 3 に最も近い 2 用量を選択した。2.5%投与群のSI値は 3.11%、5%投与群のSI値は 4.39%である。

6-5-3

Isoeugenol Exp. 3 の評価結果を表 6-5-3 および図 6-5-3 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

2.5%用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。0.5%から 2.5%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

1%投与群の 1 匹が、Day7 投与終了後から Day8 の体重測定までの間に死亡した。2.5%投与群の動物に異常が認められなかったため、毒性によるものとは考えられない。リンパ節重量および ATP 発光量の測定は同様に行ったが、データからは省いた。

Isoeugenol の判定は陽性である。

$EC_3$=2.46%　(1%および 2.5%の 2 用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。

6-6　Eugenol の試験結果

Eugenol について LLNA-DA により独立した 3 回の評価を行った。

6-6-1

Eugenol Exp. 1 の評価結果を表 6-6-1 および図 6-6-1 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

10%以上の用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。5%から 25%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

被験物質が Eugenol であり、10%用量を設定している事から、陽性対照は設けなかった。

Eugenol の判定は陽性である。

$EC_3$=5.09%　(5%および 10%の 2 用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。

6-6-2

Eugenol Exp. 2 の評価結果を表 6-6-2 および図 6-6-2 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

本試験はDay 1 、Day2、Day3、Day6に投与を行い、Day 7に摘出および測定を行った。

10%以上の用量でATP量を指標としたSI値が3を超えた。5%から25%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

被験物質がEugenolであり、10%用量を設定している事から、陽性対照は設けなかった。

Eugenolの判定は陽性である。

$EC_3$=5.59%　(5%および10%の2用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。

6-6-3

Eugenol Exp. 3の評価結果を表6-6-3および図6-6-3に示す。

VehicleはAOOを用いた。

5%以上の用量でATP量を指標としたSI値が3を超えた。5%から25%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

被験物質がEugenolであり、10%用量を設定している事から、陽性対照は設けなかった。

Eugenolの判定は陽性である。

$EC_3$=4.23%　(5%および10%の2用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。最低用量の5%投与群でSI値が3を超えたため、SI値が3に最も近い2用量を選択した。5%投与群のSI値は3.24%、10%投与群のSI値は4.79%である。

6-7　Benzocaineの試験結果

BenzocaineのLLNA-DAによる評価結果を表6-7および図6-7に示す。

VehicleはAOOを用いた。

10%以上の用量でATP量を指標としたSI値が3を超えた。5%から25%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

リンパ節重量については10%～25%の用量域で用量依存性が見られなかった。また試験群のATP発光量は個体差が大きいという特徴が認められる。

Benzocaineの判定は陽性である。

$EC_3$=6.57%　(5%および10%の2用量群のATPを指標とするSI値より求めた)。

6-8　Abietic acidの試験結果

Abietic acidのLLNA-DAによる評価結果を表6-8および図6-8に示す。

VehicleはAOOを用いた。

10%以上の用量でATP量を指標としたSI値が3を超えた。5%から25%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

Abietic acid の判定は陽性である。

$EC_3$＝7.90%　（5%および 10%の 2 用量群のATPを指標とするSI値より求めた）。

6-9　Hexylcinnamic aldehyde（HCA）の試験結果

HCA の LLNA-DA による評価結果を表 6-9 および図 6-9 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

25%用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。5%から 25%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

HCA の判定は陽性である。

$EC_3$＝11.6%　（10%および 25%の 2 用量群のATPを指標とするSI値より求めた）。

6-10　Citral の試験結果

Citral の LLNA-DA による評価結果を表 6-10 および図 6-10 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

25%用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。5%から 25%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

Citral の判定は陽性である。

$EC_3$＝15.6%　（15%および 25%の 2 用量群のATPを指標とするSI値より求めた）。

6-11　Imidazolidinyl urea の試験結果

Imidazolidinyl urea の LLNA-DA による評価結果を表 6-11 および図 6-11 に示す。

Vehicle は DMF（Dimethylformamide）を用いた。

25%以上の用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。10%から 50%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

50%用量では耳介付近の脱毛が観察され、表皮への何らかの作用と考えられる。

10%Eugenol の DMF 溶液（P. C. 1）は充分な反応が得られなかったが、同時に試験した 10%Eugenol の AOO 溶液（P. C. 2）では充分な反応が認められた。

Eugenol が DMF 中では充分な反応を示さないことには再現性があり（データには示さない）、DMF が Vehicle の試験では Eugenol は適切な陽性対照ではないといえる。

Imidazolidinyl urea の判定は陽性である。

$EC_3$＝18.8%　（10%および 25%の 2 用量群のATPを指標とするSI値より求めた）。

6-12　2-Mercaptobenzothiazol（MBT）の試験結果

MBT の LLNA-DA による評価結果を表 6-12 および図 6-12 に示す。

Vehicle は DMF を用いた。

試験した全ての用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えなかった。10%用量の ATP

発光量でVehicleに対する有意な増加が認められたが、用量依存性は認められない。

同時に試験した10%EugenolのAOO溶液（P. C. 2）では充分な反応が認められた。

本試験条件において、MBTは陰性と判定した。

6-13　$CoCl_2$の試験結果

$CoCl_2$のLLNA-DAによる評価結果を表6-13および図6-13に示す。

VehicleはDMSO（Dimethylsulfoxide）を用いた。

5%用量でATP量を指標としたSI値が3を超えた。1%から5%の用量範囲で濃度依存的な増加が確認された。

DMSO投与群はAOO群に対し、リンパ節重量、ATP発光量がそれぞれ有意に高い。DMSOはリンパ球の増殖を促す効果があると考えられる。陽性対照として設定した10% EugenolのAOO溶液（P. C. 2）では充分な反応が認められた。10%EugenolのDMSO溶液（P. C. 1）のリンパ節重量、ATP発光量の平均値はP. C. 2と比較して下回るものの、有意な差ではない。しかしながら、SI値は3を超えなかった。

$CoCl_2$の判定は陽性である。

$EC_3$=3.27%　（2.5%および5%の2用量群のATPを指標とするSI値より求めた）。

6-14　$NiSO_4$の試験結果

$NiSO_4$のLLNA-DAによる評価結果を表6-14および図6-14に示す。

VehicleはDMSOを用いた。

検体として6水和物を用い、試験液は$NiSO_4$としての濃度に調製した。

試験した全ての用量でATP量を指標としたSI値が3を超えなかった。全ての用量群のリンパ節重量、ATP発光量の平均値はVehicle群に対して増加が認められ、その幾つかは有意差も認められるが、用量依存性は認められなかった。

10%EugenolのAOO溶液（P. C. 2）では充分な反応が認められた。

本試験条件において、$NiSO_4$は陰性と判定した。

6-15　Propylparabenの試験結果

PropylparabenのLLNA-DAによる評価結果を表6-15および図6-15に示す。

VehicleはAOOを用いた。

試験した全ての用量でATP量を指標としたSI値が3を超えなかった。

10%EugenolのAOO溶液（P. C.）では充分な反応が認められた。

本試験条件において、Propylparabenは陰性と判定した。

6-16　Methyl salicylateの試験結果

Methyl salicylateのLLNA-DAによる評価結果を表6-16および図6-16に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

試験した全ての用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えなかった。

10%Eugenol の AOO 溶液（P. C.）では充分な反応が認められた。

本試験条件において、Methyl salicylate は陰性と判定した。

6-17　Benzalkonium chloride の試験結果

Benzalkonium chloride の LLNA-DA による評価結果を表 6-17 および図 6-17 に示す。

Vehicle は AOO を用いた。

1%および 2.5%用量で ATP 量を指標とした SI 値が 3 を超えた。試験した全ての用量群のリンパ節重量、ATP 発光量の平均値は、Vehicle 群に対して明確な増加が認められる。

2.5%以上の用量では耳介での刺激性と見られる変化が観察された。特に 5%では肥大が著しい。

Vehicle 群の 1 匹が麻酔操作のミスにより死亡し、n=2 となったため、有意差検定は行わなかった。残る 2 匹によるリンパ節重量、ATP 発光量の平均値は AOO 群として妥当な値である。

リンパ節重量、ATP 発光量共に、SI 値の用量依存性は認められなかった。

結果に疑いが持たれるものの、2 用量で SI 値が 3 を超えていることから、Benzalkonium chloride は陽性と判定した。

用量依存性が認められないため、$EC_3$の算出は行わなかった。

6-18　判定結果の纏め

判定結果の一覧を表 6-18 に纏めた。LLNA、GPMT/BA、HMT、HPTA の文献データと対比したところ、概ね一致する結果が得られている。

6-19　$EC_3$の纏め

ATPのSI値を指標とした$EC_3$の一覧を表 6-19 に纏めた。LLNAの文献より引用したデータと比較したところ、ほぼ一致する結果となっている。

表6-1 LLNA-DA試験結果 (2,4-Dinitrochlorobenzene、DNCB) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。
$p$値は$t$検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 10W

投与開始日: 2003年9月10日

摘出・測定日: 2003年9月17日

※ATP測定における不備があったものと思われるため、データから省く。

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | $p$値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | $p$値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 23.7 | 2.99 | 3.35 | 0.73 | 1.00 | - | 1453 | 2975 | 1611 | 1.00 | - |
| | 24.0 | 4.15 | | | | | 11748※ | | | | |
| | 23.3 | 3.74 | | | | | 4663 | | | | |
| | 25.0 | 2.53 | | | | | 2810 | | | | |
| P. C. | 23.6 | 7.51 | 10.26 | 2.04 | 3.06 | $p<0.01$ | 13351 | 17292 | 6621 | 5.81 | $p<0.05$ |
| | 22.4 | 12.44 | | | | | 27023 | | | | |
| | 24.5 | 10.52 | | | | | 15905 | | | | |
| | 22.3 | 10.57 | | | | | 12892 | | | | |
| DNCB 0.025% | 22.1 | 8.80 | 6.87 | 1.68 | 2.05 | $p<0.05$ | 11884 | 9610 | 3321 | 3.23 | $p<0.05$ |
| | 24.7 | 6.13 | | | | | 11146 | | | | |
| | 22.8 | 5.69 | | | | | 5799 | | | | |
| DNCB 0.05% | 23.4 | 6.85 | 6.88 | 0.20 | 2.05 | $p<0.01$ | 10848 | 8903 | 1768 | 2.99 | $p<0.05$ |
| | 24.8 | 7.09 | | | | | 7394 | | | | |
| | 23.1 | 6.70 | | | | | 8468 | | | | |
| DNCB 0.1% | 22.4 | 8.73 | 8.05 | 0.64 | 2.40 | $p<0.01$ | 13205 | 9541 | 3318 | 3.21 | $p<0.05$ |
| | 23.7 | 7.96 | | | | | 8679 | | | | |
| | 21.9 | 7.45 | | | | | 6740 | | | | |
| DNCB 0.25% | 26.1 | 21.93 | 19.65 | 2.42 | 5.86 | $p<0.01$ | 34300 | 25618 | 9402 | 8.61 | $p<0.05$ |
| | 21.0 | 19.91 | | | | | 26924 | | | | |
| | 20.4 | 17.11 | | | | | 15631 | | | | |
| DNCB 0.5% | 25.3 | 23.94 | 26.11 | 2.41 | 7.79 | $p<0.01$ | 33092 | 36673 | 8788 | 12.33 | $p<0.01$ |
| | 23.3 | 25.70 | | | | | 46685 | | | | |
| | 25.0 | 28.70 | | | | | 30241 | | | | |
| DNCB 1% | 24.6 | 34.00 | 32.83 | 1.46 | 9.79 | $p<0.01$ | 40795 | 36682 | 4177 | 12.33 | $p<0.01$ |
| | 24.0 | 33.31 | | | | | 36807 | | | | |
| | 22.0 | 31.19 | | | | | 32445 | | | | |

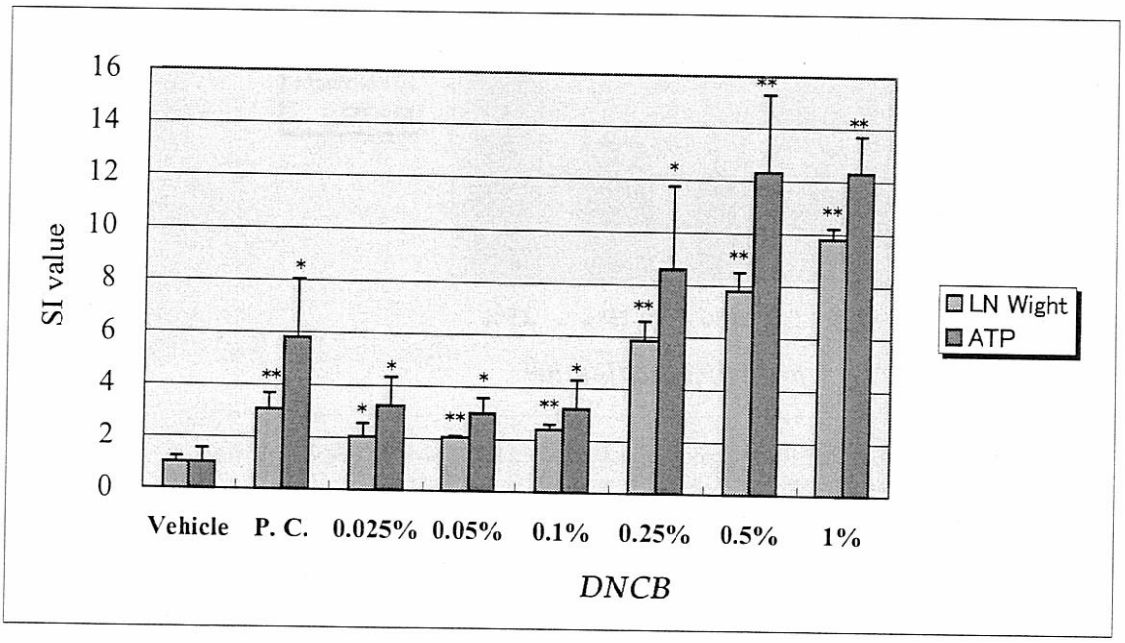



図6-1 DA-LLNA試験における2,4-Dinitrochlorobenzene(DNCB)のリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p<0.05$、 ** $p<0.01$。Vehicle;AOO、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。

表6-2 LLNA-DA試験結果 (*p*-Phenylenediamine、pPDA) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。
*p*値は*t*検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 10W
投与開始日: 2003年7月2日
摘出・測定日: 2003年7月9日

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | *p*値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | *p*値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 22.7 | 4.19 | 4.55 | 0.33 | 1.00 | - | 4927 | 4411 | 753 | 1.00 | - |
| | 23.2 | 4.63 | | | | | 3547 | | | | |
| | 24.9 | 4.83 | | | | | 4758 | | | | |
| P. C. | 24.4 | 10.89 | 9.21 | 1.46 | 2.02 | $p<0.01$ | 17020 | 14388 | 2471 | 3.26 | $p<0.01$ |
| | 21.8 | 8.24 | | | | | 14029 | | | | |
| | 23.7 | 8.50 | | | | | 12117 | | | | |
| pPDA 0.05% | 23.0 | 7.74 | 6.61 | 1.16 | 1.45 | $p<0.05$ | 11478 | 7431 | 3549 | 1.68 | |
| | 23.0 | 5.42 | | | | | 4851 | | | | |
| | 23.8 | 6.68 | | | | | 5964 | | | | |
| pPDA 0.1% | 23.7 | 7.76 | 7.39 | 1.18 | 1.62 | $p<0.05$ | 10227 | 8793 | 2100 | 1.99 | $p<0.05$ |
| | 25.4 | 6.07 | | | | | 6383 | | | | |
| | 23.5 | 8.34 | | | | | 9770 | | | | |
| pPDA 0.25% | 22.8 | 10.03 | 9.82 | 0.40 | 2.16 | $p<0.01$ | 13459 | 11490 | 3472 | 2.61 | $p<0.05$ |
| | 23.6 | 10.07 | | | | | 13529 | | | | |
| | 24.1 | 9.36 | | | | | 7481 | | | | |
| pPDA 15% | 24.2 | 14.41 | 17.02 | 2.46 | 3.74 | $p<0.05$ | 16950 | 25206 | 8185 | 5.72 | $p<0.05$ |
| | 25.6 | 17.35 | | | | | 25352 | | | | |
| | 21.3 | 19.29 | | | | | 33318 | | | | |

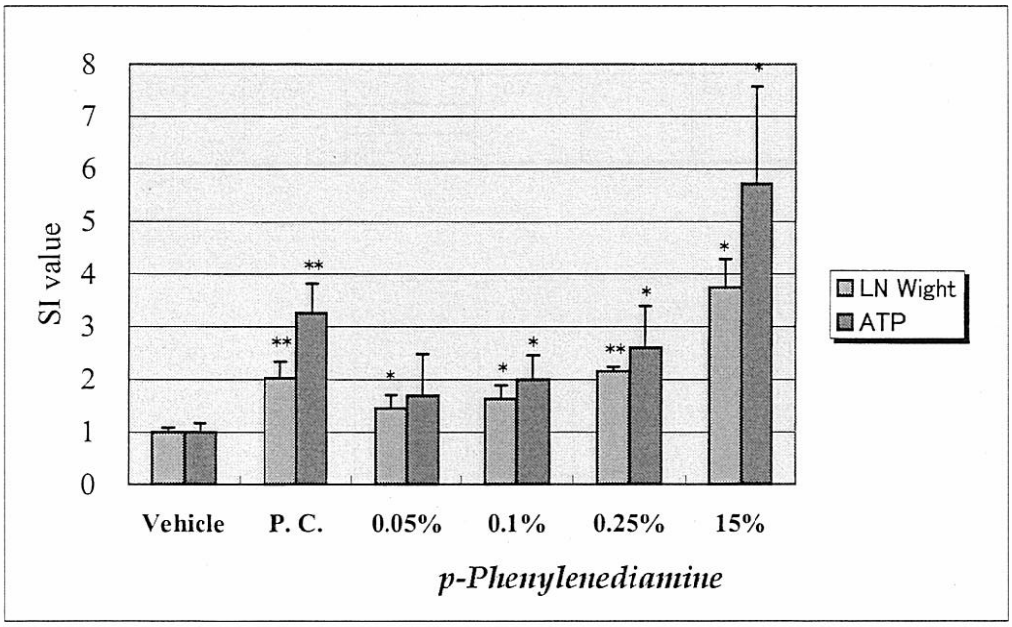



図6-2 DA-LLNA試験における*p*-Phenylenediamineのリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p<0.05$、 ** $p<0.01$。Vehicle;AOO、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。

表6-3 LLNA-DA試験結果 (Trimellitic anhydride、TMA) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。
$p$値は$t$検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 10W
投与開始日: 2003年6月4日
摘出・測定日: 2003年6月11日

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | $p$値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | $p$値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 23.3 | 3.76 | 3.73 | 0.15 | 1.00 | - | 2518 | 2637 | 375 | 1.00 | - |
| | 23.5 | 3.80 | | | | | 2815 | | | | |
| | 22.5 | 3.52 | | | | | 3040 | | | | |
| | 24.2 | 3.85 | | | | | 2175 | | | | |
| P. C. | 24.0 | 7.33 | 8.10 | 1.11 | 2.17 | $p<0.05$ | 14306 | 11193 | 3638 | 4.24 | |
| | 22.2 | 9.37 | | | | | 12080 | | | | |
| | 22.7 | 7.59 | | | | | 7194 | | | | |
| TMA 0.15% | 23.7 | 5.62 | 6.21 | 0.82 | 1.66 | $p<0.05$ | 4364 | 6922 | 2639 | 2.62 | |
| | 23.6 | 5.87 | | | | | 9635 | | | | |
| | 25.0 | 7.14 | | | | | 6768 | | | | |
| TMA 1.5% | 23.8 | 16.46 | 15.09 | 1.77 | 4.04 | $p<0.01$ | 40072 | 31784 | 7834 | 12.05 | $p<0.05$ |
| | 22.1 | 15.71 | | | | | 30779 | | | | |
| | 22.4 | 13.09 | | | | | 24501 | | | | |
| TMA 15% | 22.1 | 29.98 | 27.28 | 2.34 | 7.31 | $p<0.01$ | 65230 | 55493 | 8895 | 21.04 | $p<0.01$ |
| | 24.1 | 25.86 | | | | | 53458 | | | | |
| | 20.6 | 25.99 | | | | | 47792 | | | | |

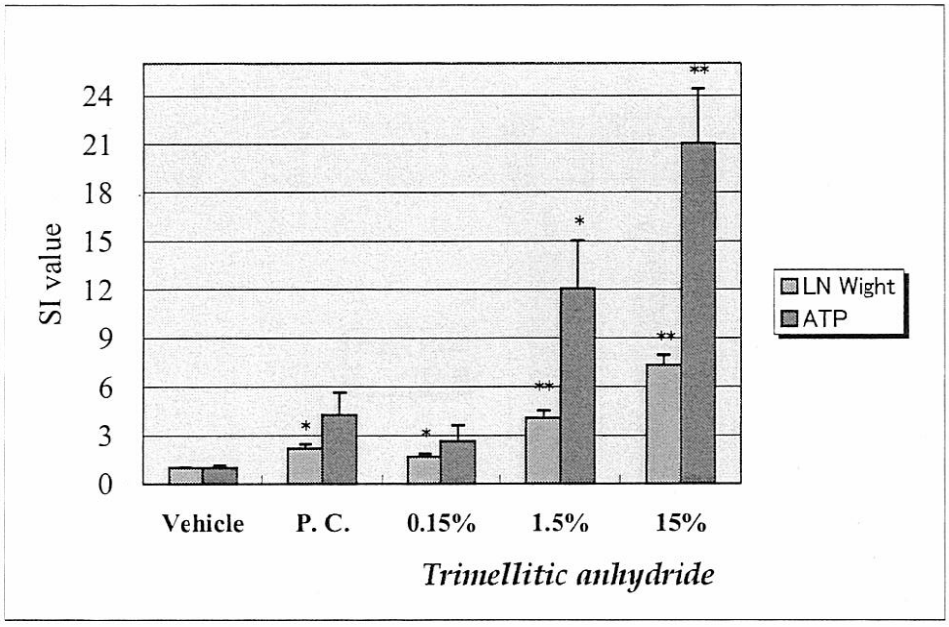



図6-3 DA-LLNA試験におけるTrimellitic anhydrideのリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p<0.05$、 ** $p<0.01$。Vehicle;AOO、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。

表6-4 LLNA-DA試験結果（Cinnamic aldehyde） Vehicle；AOO（acetone/olive oil (4:1, v/v)）、P. C. ；Eugenol 10%/AOO。
$p$値は$t$検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢： 10W
投与開始日： 2003年7月2日
摘出・測定日： 2003年7月9日

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | $p$値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | $p$値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 22.7 | 4.19 | 4.55 | 0.33 | 1.00 | - | 4927 | 4411 | 753 | 1.00 | - |
| | 23.2 | 4.63 | | | | | 3547 | | | | |
| | 24.9 | 4.83 | | | | | 4758 | | | | |
| P. C. | 24.4 | 10.89 | 9.21 | 1.46 | 2.02 | $p<0.01$ | 17020 | 14388 | 2471 | 3.26 | $p<0.01$ |
| | 21.8 | 8.24 | | | | | 14029 | | | | |
| | 23.7 | 8.50 | | | | | 12117 | | | | |
| Cinnamic aldehyde 1% | 22.3 | 5.98 | 7.34 | 1.28 | 1.61 | $p<0.05$ | 6780 | 9199 | 3547 | 2.09 | |
| | 21.7 | 8.52 | | | | | 13271 | | | | |
| | 23.8 | 7.53 | | | | | 7545 | | | | |
| Cinnamic aldehyde 2.5% | 23.6 | 9.63 | 8.86 | 0.92 | 1.95 | $p<0.01$ | 13624 | 11743 | 2487 | 2.66 | $p<0.01$ |
| | 21.5 | 7.84 | | | | | 8924 | | | | |
| | 22.2 | 9.11 | | | | | 12681 | | | | |
| Cinnamic aldehyde 5% | 21.4 | 12.36 | 11.86 | 0.50 | 2.61 | $p<0.01$ | 21975 | 19502 | 2344 | 4.42 | $p<0.01$ |
| | 24.9 | 11.36 | | | | | 17313 | | | | |
| | 21.5 | 11.87 | | | | | 19218 | | | | |
| Cinnamic aldehyde 15% | 24.3 | 15.29 | 16.74 | 2.38 | 3.68 | $p<0.05$ | 20037 | 20848 | 3245 | 4.73 | $p<0.01$ |
| | 24.2 | 15.44 | | | | | 18085 | | | | |
| | 23.4 | 19.49 | | | | | 24421 | | | | |

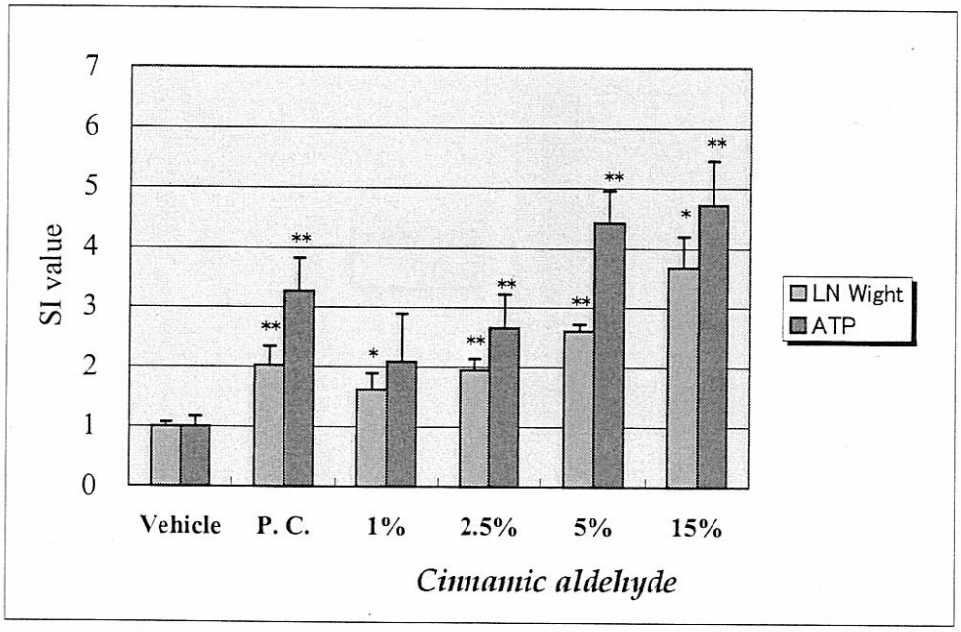



図6-4 DA-LLNA試験におけるCinnamic aldehydeのリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、＊ $p<0.05$、 ＊＊ $p<0.01$。Vehicle；AOO、P. C. ；Eugenol 10%/AOO。

表6-5-1 LLNA-DA試験結果 (Isoeugenol Exp. 1) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。
$p$値は$t$検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 10W
投与開始日: 2003年9月10日
摘出・測定日: 2003年9月17日
※ATP測定における不備があったものと思われるため、データから省く。

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | $p$値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | $p$値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 23.7 | 2.99 | 3.35 | 0.73 | 1.00 | - | 1453 | 2975 | 1611 | 1.00 | - |
| | 24.0 | 4.15 | | | | | 11748※ | | | | |
| | 23.3 | 3.74 | | | | | 4663 | | | | |
| | 25.0 | 2.53 | | | | | 2810 | | | | |
| P. C. | 23.6 | 7.51 | 10.26 | 2.04 | 3.06 | $p<0.01$ | 13351 | 17292 | 6621 | 5.81 | $p<0.05$ |
| | 22.4 | 12.44 | | | | | 27023 | | | | |
| | 24.5 | 10.52 | | | | | 15905 | | | | |
| | 22.3 | 10.57 | | | | | 12892 | | | | |
| Isoeugenol 0.5% | 25.7 | 6.84 | 6.08 | 1.09 | 1.81 | $p<0.05$ | 5273 | 4472 | 1594 | 1.50 | |
| | 26.3 | 6.56 | | | | | 5507 | | | | |
| | 26.4 | 4.83 | | | | | 2636 | | | | |
| Isoeugenol 1% | 24.6 | 8.28 | 7.20 | 1.12 | 2.15 | $p<0.01$ | 8506 | 6778 | 1773 | 2.28 | |
| | 24.7 | 6.04 | | | | | 4963 | | | | |
| | 21.3 | 7.27 | | | | | 6866 | | | | |
| Isoeugenol 2.5% | 22.0 | 8.66 | 8.74 | 0.10 | 2.61 | $p<0.01$ | 8514 | 8270 | 498 | 2.78 | $p<0.01$ |
| | 24.8 | 8.70 | | | | | 8600 | | | | |
| | 25.1 | 8.85 | | | | | 7698 | | | | |
| Isoeugenol 5% | 21.9 | 8.37 | 9.75 | 1.20 | 2.91 | $p<0.01$ | 8359 | 10087 | 2055 | 3.39 | $p<0.01$ |
| | 24.3 | 10.35 | | | | | 12359 | | | | |
| | 24.6 | 10.53 | | | | | 9543 | | | | |
| Isoeugenol 10% | 23.9 | 12.73 | 13.66 | 1.74 | 4.07 | $p<0.01$ | 20431 | 16913 | 3540 | 5.68 | $p<0.01$ |
| | 23.6 | 12.58 | | | | | 16956 | | | | |
| | 23.3 | 15.66 | | | | | 13352 | | | | |
| Isoeugenol 25% | 25.1 | 19.69 | 21.03 | 1.56 | 6.27 | $p<0.01$ | 94272 | 105988 | 57757 | 35.63 | |
| | 25.2 | 22.74 | | | | | 168705 | | | | |
| | 26.6 | 20.65 | | | | | 54988 | | | | |
| Isoeugenol 50% | 24.4 | 22.36 | 20.51 | 2.64 | 6.12 | $p<0.01$ | 90220 | 68166 | 19110 | 22.91 | $p<0.05$ |
| | 21.4 | 17.48 | | | | | 56484 | | | | |
| | 24.8 | 21.68 | | | | | 57796 | | | | |

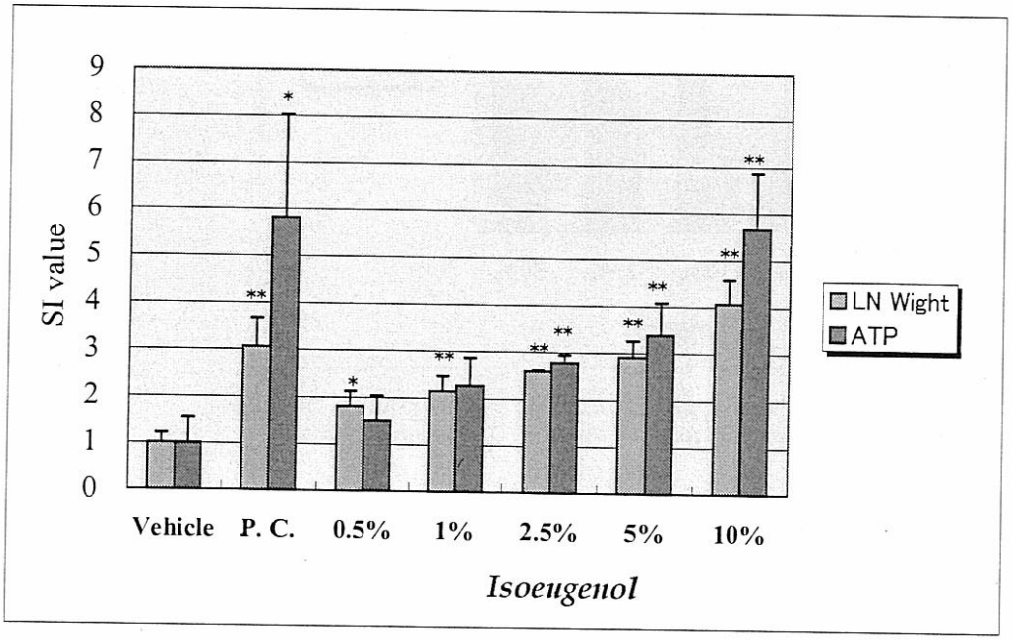



図6-5-1 DA-LLNA試験におけるIsoeugenol(Exp. 1)のリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p<0.05$、 ** $p<0.01$。Vehicle;AOO、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。

表6-5-2 LLNA-DA試験結果 (Isoeugenol Exp. 2) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。
$p$値は$t$検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 9W
投与開始日: 2003年10月8日
摘出・測定日: 2003年10月15日

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | $p$値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | $p$値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 23.8 | 4.18 | 4.19 | 0.01 | 1.00 | - | 1460 | 3528 | 1881 | 1.00 | - |
| | 24.0 | 4.20 | | | | | 5137 | | | | |
| | 24.2 | 4.19 | | | | | 3988 | | | | |
| P. C. | 24.8 | 9.52 | 10.61 | 1.25 | 2.53 | $p<0.05$ | 22813 | 24980 | 5267 | 7.08 | $p<0.01$ |
| | 22.8 | 10.34 | | | | | 21142 | | | | |
| | 23.6 | 11.97 | | | | | 30985 | | | | |
| Isoeugenol 2.5% | 22.2 | 7.86 | 6.73 | 1.07 | 1.61 | | 15638 | 10982 | 4057 | 3.11 | $p<0.05$ |
| | 22.9 | 5.73 | | | | | 9113 | | | | |
| | 23.0 | 6.59 | | | | | 8197 | | | | |
| Isoeugenol 5% | 23.2 | 8.61 | 9.48 | 1.29 | 2.26 | $p<0.05$ | 15773 | 15473 | 4411 | 4.39 | $p<0.05$ |
| | 23.5 | 10.96 | | | | | 19726 | | | | |
| | 24.4 | 8.88 | | | | | 10920 | | | | |
| Isoeugenol 10% | 25.5 | 15.92 | 14.59 | 1.42 | 3.48 | $p<0.01$ | 24776 | 23869 | 805 | 6.77 | $p<0.01$ |
| | 24.7 | 13.10 | | | | | 23236 | | | | |
| | 23.5 | 14.74 | | | | | 23595 | | | | |
| Isoeugenol 25% | 25.1 | 22.08 | 21.72 | 0.59 | 5.18 | $p<0.01$ | 40328 | 43598 | 5920 | 12.36 | $p<0.01$ |
| | 24.0 | 22.03 | | | | | 50432 | | | | |
| | 22.9 | 21.04 | | | | | 40035 | | | | |
| Isoeugenol 50% | 24.1 | 19.43 | 20.31 | 2.63 | 4.85 | $p<0.01$ | 43389 | 37359 | 7894 | 10.59 | $p<0.01$ |
| | 22.2 | 18.24 | | | | | 28424 | | | | |
| | 23.6 | 23.27 | | | | | 40263 | | | | |

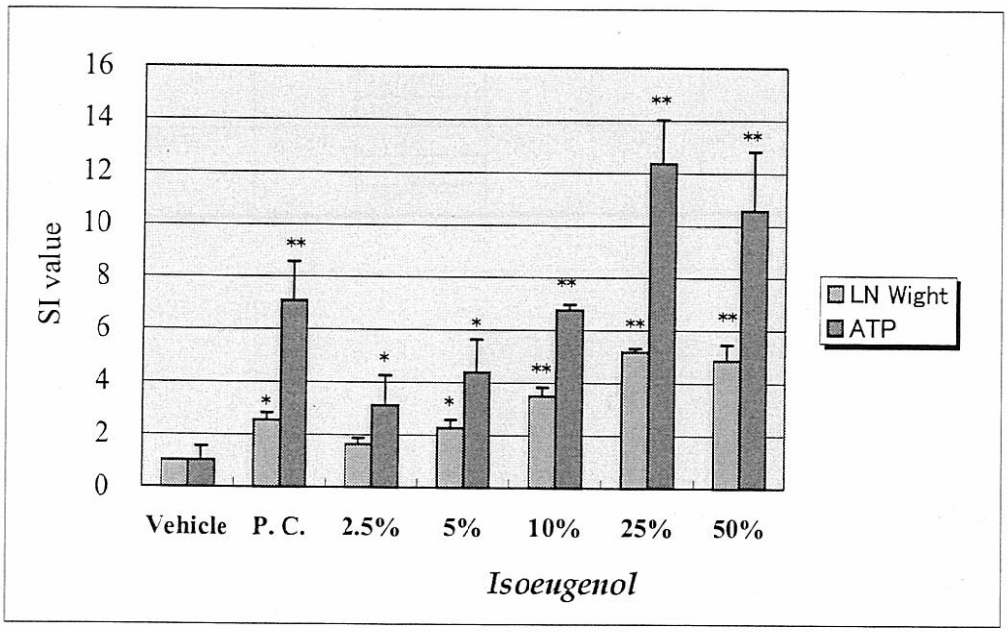



図6-5-2 DA-LLNA試験におけるIsoeugenol(Exp. 2)のリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p<0.05$、 ** $p<0.01$。Vehicle;AOO、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。

表6-5-3 LLNA-DA試験結果 (Isoeugenol Exp. 3) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。
*p*値は*t*検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 10W
投与開始日: 2003年6月25日
摘出・測定日: 2003年7月2日
※データから省く。1%投与群はn=2であるため有意差の検定は行わなかった。

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | *p*値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | *p*値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 24.5 | 4.10 | 3.87 | 0.62 | 1.00 | - | 4418 | 3231 | 964 | 1.00 | - |
| | 23.1 | 4.21 | | | | | 2728 | | | | |
| | 21.8 | 4.23 | | | | | 3557 | | | | |
| | 20.8 | 2.95 | | | | | 2221 | | | | |
| P. C. | 22.2 | 9.27 | 9.07 | 0.36 | 2.34 | $p<0.01$ | 15164 | 13709 | 1212 | 4.24 | $p<0.01$ |
| | 23.3 | 9.00 | | | | | 14162 | | | | |
| | 22.8 | 9.41 | | | | | 12392 | | | | |
| | 21.4 | 8.59 | | | | | 13118 | | | | |
| Isoeugenol 0.5% | 20.9 | 4.19 | 4.23 | 0.53 | 1.09 | | 4293 | 3929 | 422 | 1.22 | |
| | 23.1 | 4.78 | | | | | 4028 | | | | |
| | 22.6 | 3.73 | | | | | 3467 | | | | |
| Isoeugenol 1% | 21.6 | 7.26 | 6.79 | 0.67 | 1.75 | *N. D.* | 11270 | 8962 | 3264 | 2.77 | *N. D.* |
| | 22.1 | 6.31 | | | | | 6655 | | | | |
| | 死亡 | ※6.31 | | | | | ※254 | | | | |
| Isoeugenol 2.5% | 21.1 | 7.87 | 6.92 | 1.46 | 1.79 | $p<0.05$ | 12332 | 9712 | 3172 | 3.01 | $p<0.05$ |
| | 22.9 | 7.65 | | | | | 10619 | | | | |
| | 20.4 | 5.24 | | | | | 6185 | | | | |

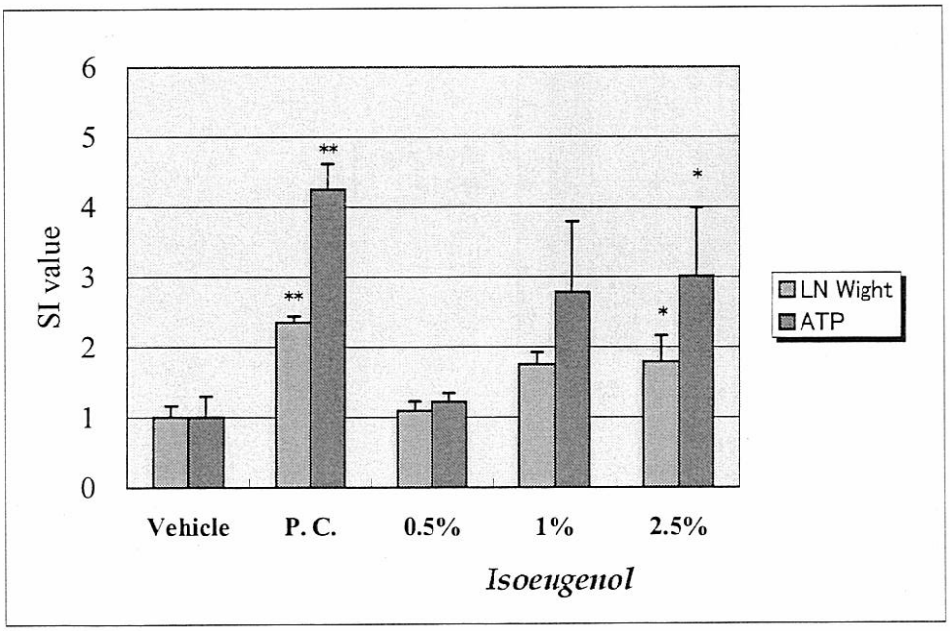



図6-5-3 DA-LLNA試験におけるIsoeugenol(Exp. 3)のリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p<0.05$、 ** $p<0.01$。Vehicle;AOO、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。
1%投与群で1匹が死亡しn=2となったため、有意差検定は行わなかった。

表6-6-1 LLNA-DA試験結果 (Eugenol-Exp. 1) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))。
$p$値は$t$検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

| | |
|---|---|
| 投与開始時動物週齢: | 10W |
| 投与開始日: | 2003年10月1日 |
| 摘出・測定日: | 2003年10月8日 |

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | $p$値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | $p$値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 25.6 | 3.90 | 3.79 | 0.27 | 1.00 | - | 2186 | 2474 | 416 | 1.00 | - |
| | 24.5 | 3.66 | | | | | 2177 | | | | |
| | 23.8 | 3.50 | | | | | 2470 | | | | |
| | 26.7 | 4.11 | | | | | 3064 | | | | |
| Eugenol 5% | 26.6 | 5.96 | 7.17 | 2.61 | 1.89 | | 6473 | 7226 | 2474 | 2.92 | |
| | 23.6 | 5.38 | | | | | 5215 | | | | |
| | 24.2 | 10.17 | | | | | 9989 | | | | |
| Eugenol 10% | 24.4 | 12.13 | 11.22 | 2.30 | 2.96 | $p<0.01$ | 25658 | 18180 | 6487 | 7.35 | |
| | 23.7 | 12.92 | | | | | 14074 | | | | |
| | 24.5 | 8.60 | | | | | 14808 | | | | |
| Eugenol 25% | 23.3 | 12.14 | 14.39 | 2.78 | 3.79 | $p<0.01$ | 19108 | 27022 | 8976 | 10.92 | $p<0.05$ |
| | 21.2 | 13.53 | | | | | 25183 | | | | |
| | 23.3 | 17.49 | | | | | 36776 | | | | |

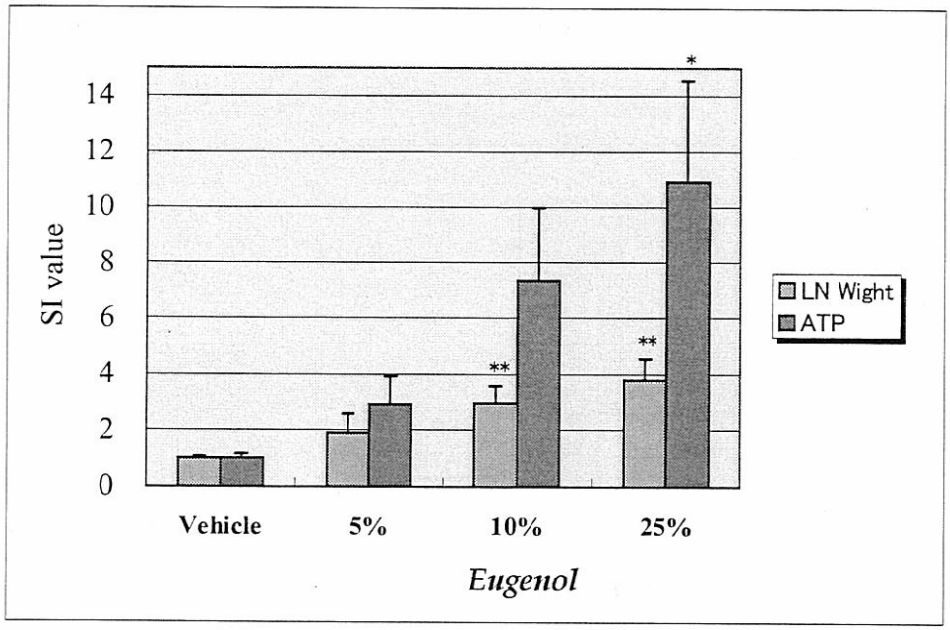



図6-6-1 DA-LLNA試験におけるEugenol(Exp. 1)のリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p<0.05$、 ** $p<0.01$。Vehicle:AOO。

表6-6-2 LLNA-DA試験結果 (Eugenol-Exp. 2) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))。
$p$値は$t$検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 10W
投与開始日: 2003年10月1日
摘出・測定日: 2003年10月7日

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | $p$値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | $p$値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 26.6 | 4.23 | 4.25 | 0.25 | 1.00 | - | 2388 | 3207 | 554 | 1.00 | - |
| | 26.4 | 4.02 | | | | | 3530 | | | | |
| | 23.5 | 4.14 | | | | | 3560 | | | | |
| | 26.0 | 4.59 | | | | | 3351 | | | | |
| Eugenol 5% | 22.9 | 8.63 | 7.26 | 1.61 | 1.71 | | 12648 | 8994 | 3456 | 2.80 | |
| | 26.5 | 7.66 | | | | | 8559 | | | | |
| | 25.2 | 5.48 | | | | | 5777 | | | | |
| Eugenol 10% | 24.2 | 11.87 | 10.45 | 1.29 | 2.46 | $p<0.01$ | 17950 | 14325 | 3139 | 4.47 | $p<0.05$ |
| | 25.1 | 9.34 | | | | | 12507 | | | | |
| | 26.4 | 10.14 | | | | | 12520 | | | | |
| Eugenol 25% | 26.1 | 14.54 | 14.63 | 0.16 | 3.45 | $p<0.01$ | 28932 | 18029 | 10277 | 5.62 | |
| | 24.1 | 14.54 | | | | | 8520 | | | | |
| | 25.1 | 14.81 | | | | | 16636 | | | | |

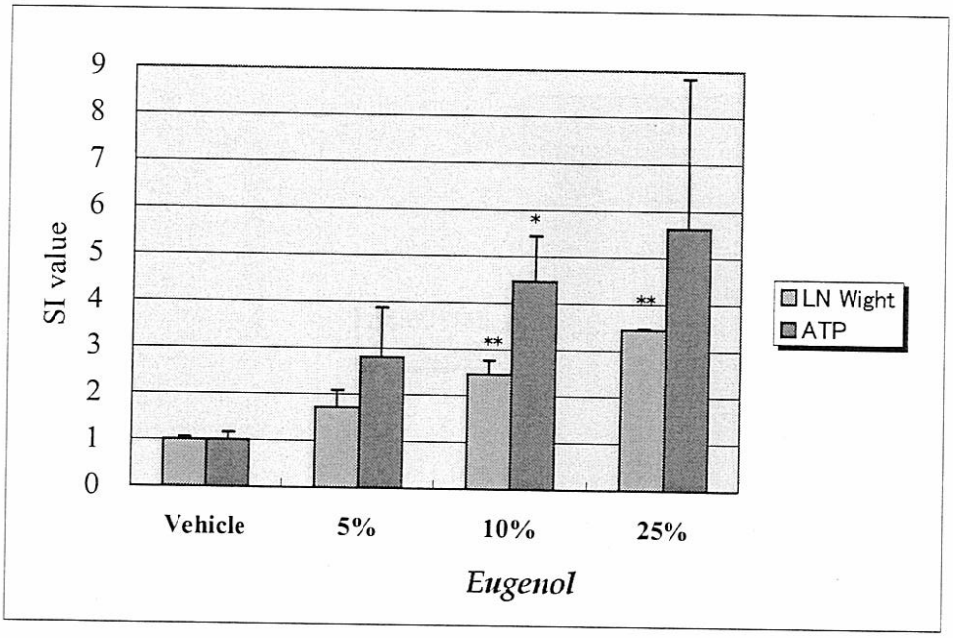



図6-6-2 DA-LLNA試験におけるEugenol(Exp. 2)のリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p<0.05$、 ** $p<0.01$。Vehicle;AOO。

表6-6-3 LLNA-DA試験結果 (Eugenol-Exp. 3) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))。
$p$値は$t$検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 9W
投与開始日: 2003年7月30日
摘出・測定日: 2003年8月6日

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | $p$値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | $p$値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 24.8 | 4.51 | 4.37 | 0.23 | 1.00 | - | 3759 | 3871 | 344 | 1.00 | - |
| | 20.8 | 4.63 | | | | | 3995 | | | | |
| | 21.3 | 4.18 | | | | | 3461 | | | | |
| | 22.5 | 4.17 | | | | | 4269 | | | | |
| Eugenol 5% | 21.7 | 7.19 | 7.32 | 0.31 | 1.67 | $p<0.01$ | 12594 | 12533 | 2714 | 3.24 | $p<0.05$ |
| | 21.5 | 7.68 | | | | | 15216 | | | | |
| | 23.1 | 7.10 | | | | | 9790 | | | | |
| Eugenol 10% | 22.3 | 9.07 | 10.19 | 1.56 | 2.33 | $p<0.01$ | 16624 | 18535 | 3636 | 4.79 | $p<0.01$ |
| | 25.2 | 12.35 | | | | | 23785 | | | | |
| | 26.4 | 9.01 | | | | | 15667 | | | | |
| | 21.3 | 10.31 | | | | | 18066 | | | | |
| Eugenol 25% | 21.8 | 11.86 | 12.79 | 0.89 | 2.92 | $p<0.01$ | 26107 | 27372 | 1694 | 7.07 | $p<0.01$ |
| | 22.6 | 12.86 | | | | | 26713 | | | | |
| | 21.9 | 13.64 | | | | | 29297 | | | | |

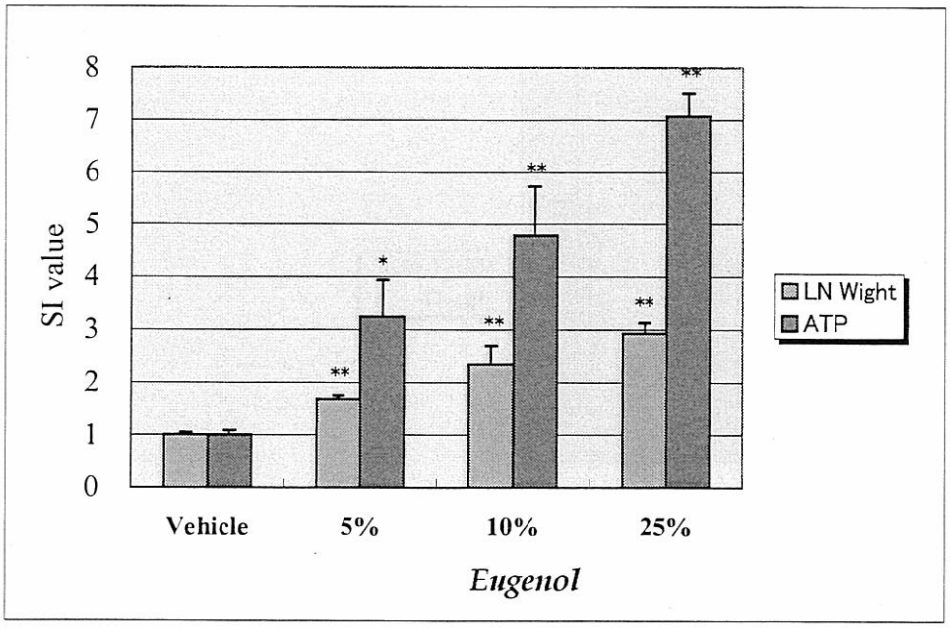



図6-6-3 DA-LLNA試験におけるEugenol(Exp. 3)のリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p<0.05$、 ** $p<0.01$。Vehicle;AOO。

表6-7 LLNA-DA試験結果 (Benzocaine) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。
$p$値は$t$検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 10W
投与開始日: 2003年9月3日
摘出・測定日: 2003年9月10日

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | $p$値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | $p$値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 24.5 | 3.01 | 3.39 | 0.39 | 1.00 | - | 2660 | 2580 | 518 | 1.00 | - |
| | 25.6 | 3.71 | | | | | 2856 | | | | |
| | 24.0 | 3.09 | | | | | 1828 | | | | |
| | 25.6 | 3.74 | | | | | 2975 | | | | |
| P. C. | 21.9 | 10.80 | 9.29 | 1.20 | 2.74 | $p<0.01$ | 19298 | 15859 | 3223 | 6.15 | $p<0.01$ |
| | 22.1 | 9.44 | | | | | 17360 | | | | |
| | 22.3 | 9.04 | | | | | 14953 | | | | |
| | 23.6 | 7.89 | | | | | 11827 | | | | |
| Benzocaine 5% | 25.1 | 6.92 | 5.94 | 1.09 | 1.75 | $p<0.01$ | 10495 | 6766 | 3722 | 2.62 | |
| | 25.6 | 4.76 | | | | | 3052 | | | | |
| | 24.1 | 6.14 | | | | | 6751 | | | | |
| Benzocaine 10% | 22.6 | 6.69 | 7.12 | 0.78 | 2.10 | $p<0.01$ | 10314 | 9857 | 1312 | 3.82 | $p<0.01$ |
| | 21.3 | 8.02 | | | | | 10880 | | | | |
| | 23.3 | 6.64 | | | | | 8378 | | | | |
| Benzocaine 25% | 24.4 | 6.41 | 6.72 | 0.78 | 1.98 | $p<0.01$ | 10512 | 12480 | 6887 | 4.84 | |
| | 24.6 | 6.14 | | | | | 6793 | | | | |
| | 24.7 | 7.60 | | | | | 20137 | | | | |

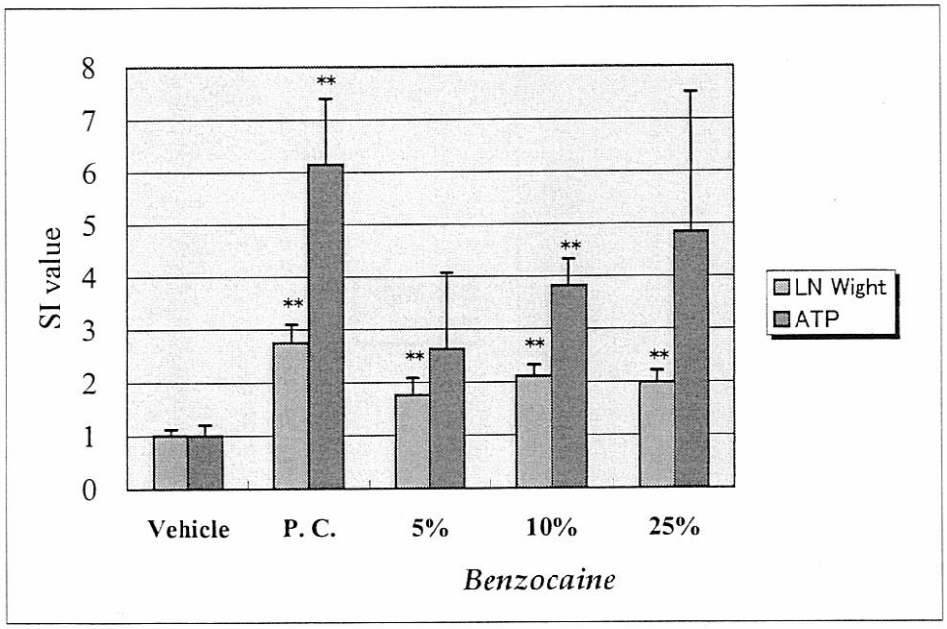



図6-7 DA-LLNA試験におけるBenzocaineのリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p<0.05$、 ** $p<0.01$。Vehicle;AOO、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。

表6-8 LLNA-DA試験結果 (Abietic acid) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。
$p$値は$t$検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 10W
投与開始日: 2003年8月27日
摘出・測定日: 2003年9月3日

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | $p$値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | $p$値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 22.7 | 3.80 | 3.83 | 0.17 | 1.00 | - | 3529 | 3014 | 436 | 1.00 | - |
| | 24.3 | 4.04 | | | | | 3106 | | | | |
| | 21.7 | 3.85 | | | | | 2949 | | | | |
| | 24.4 | 3.63 | | | | | 2473 | | | | |
| P. C. | 25.3 | 11.21 | 9.59 | 1.35 | 2.50 | $p<0.01$ | 20105 | 15535 | 3114 | 5.15 | $p<0.01$ |
| | 25.7 | 8.46 | | | | | 14663 | | | | |
| | 24.6 | 10.18 | | | | | 14233 | | | | |
| | 25.3 | 8.50 | | | | | 13137 | | | | |
| Abietic acid 5% | 23.4 | 5.19 | 5.87 | 0.73 | 1.53 | $p<0.05$ | 4143 | 6752 | 2472 | 2.24 | |
| | 19.6 | 5.79 | | | | | 9059 | | | | |
| | 24.1 | 6.64 | | | | | 7056 | | | | |
| Abietic acid 10% | 23.6 | 7.70 | 7.55 | 0.13 | 1.97 | $p<0.01$ | 13190 | 10701 | 2421 | 3.55 | $p<0.05$ |
| | 24.8 | 7.44 | | | | | 8354 | | | | |
| | 24.0 | 7.52 | | | | | 10561 | | | | |
| Abietic acid 25% | 23.7 | 11.19 | 11.28 | 0.24 | 2.95 | $p<0.01$ | 20693 | 18857 | 1793 | 6.26 | $p<0.01$ |
| | 23.3 | 11.10 | | | | | 17109 | | | | |
| | 22.5 | 11.55 | | | | | 18770 | | | | |

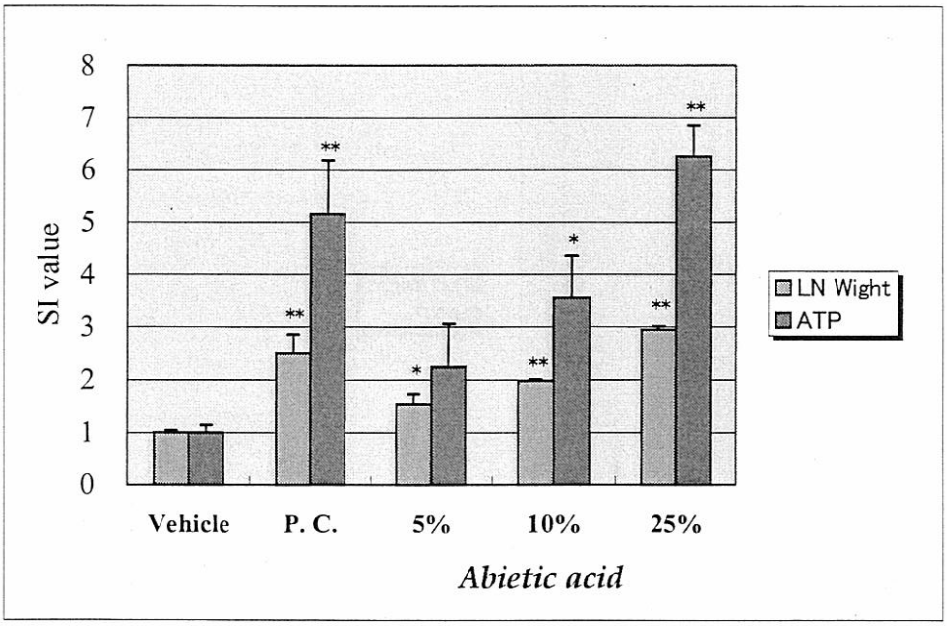



図6-8 DA-LLNA試験におけるAbietic acidのリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p<0.05$、 ** $p<0.01$。Vehicle;AOO、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。

表6-9 LLNA-DA試験結果（Hexylcinnamic aldehyde、HCA） Vehicle；AOO（acetone/olive oil (4:1, v/v)）、P. C. ；Eugenol 10%/AOO。
$p$値は$t$検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢： 9W
投与開始日： 2003年7月30日
摘出・測定日： 2003年8月6日

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | $p$値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | $p$値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 24.8 | 4.51 | 4.37 | 0.23 | 1.00 | - | 3759 | 3871 | 344 | 1.00 | - |
| | 20.8 | 4.63 | | | | | 3995 | | | | |
| | 21.3 | 4.18 | | | | | 3461 | | | | |
| | 22.5 | 4.17 | | | | | 4269 | | | | |
| P. C. | 22.3 | 9.07 | 10.19 | 1.56 | 2.33 | $p<0.01$ | 16624 | 18535 | 3636 | 4.79 | $p<0.01$ |
| | 25.2 | 12.35 | | | | | 23785 | | | | |
| | 26.4 | 9.01 | | | | | 15667 | | | | |
| | 21.3 | 10.31 | | | | | 18066 | | | | |
| HCA 5% | 21.6 | 5.62 | 4.69 | 0.87 | 1.07 | | 7375 | 5005 | 2053 | 1.29 | |
| | 21.2 | 3.90 | | | | | 3858 | | | | |
| | 21.0 | 4.56 | | | | | 3782 | | | | |
| HCA 10% | 23.4 | 8.38 | 7.94 | 1.01 | 1.82 | $p<0.05$ | 9217 | 9981 | 2384 | 2.58 | $p<0.05$ |
| | 22.0 | 8.65 | | | | | 12654 | | | | |
| | 21.6 | 6.78 | | | | | 8072 | | | | |
| HCA 25% | 19.8 | 12.55 | 12.84 | 1.17 | 2.94 | $p<0.01$ | 30420 | 25038 | 7083 | 6.47 | $p<0.05$ |
| | 21.9 | 14.13 | | | | | 27682 | | | | |
| | 20.5 | 11.85 | | | | | 17014 | | | | |

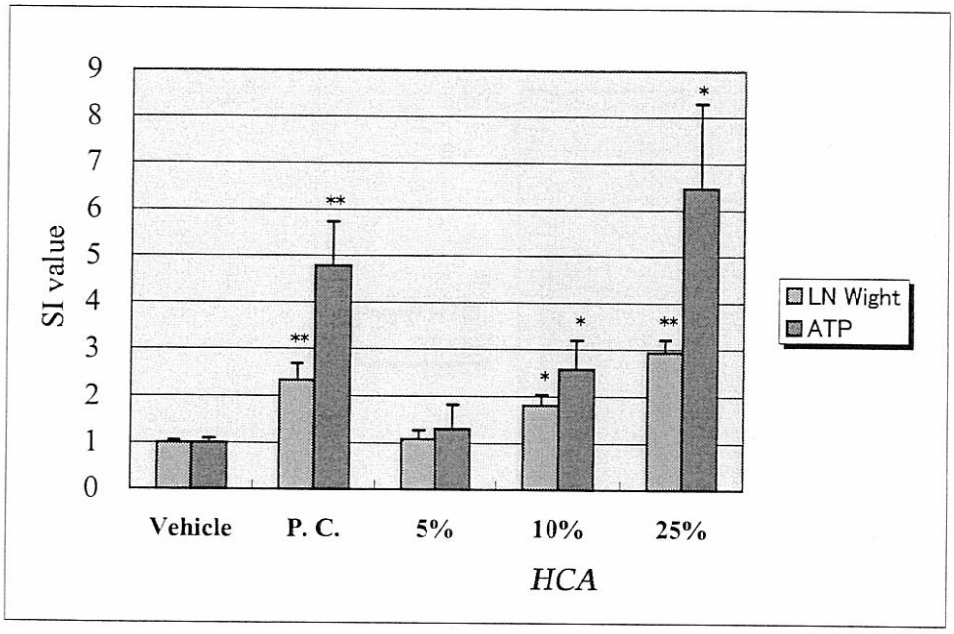



図6-9 DA-LLNA試験におけるHexylcinnamic aldehyde（HCA）のリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p<0.05$、 ** $p<0.01$。Vehicle；AOO、P. C. ；Eugenol 10%/AOO。

表6-10 LLNA-DA試験結果 (Citral) Vehicle;AOO溶媒(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。
$p$値は$t$検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢: 10W
投与開始日: 2003年7月2日
摘出・測定日: 2003年7月9日

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | $p$値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | $p$値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 22.7 | 4.19 | 4.55 | 0.33 | 1.00 | - | 4927 | 4411 | 753 | 1.00 | - |
| | 23.2 | 4.63 | | | | | 3547 | | | | |
| | 24.9 | 4.83 | | | | | 4758 | | | | |
| P. C. | 24.4 | 10.89 | 9.21 | 1.46 | 2.02 | $p<0.01$ | 17020 | 14388 | 2471 | 3.26 | $p<0.01$ |
| | 21.8 | 8.24 | | | | | 14029 | | | | |
| | 23.7 | 8.50 | | | | | 12117 | | | | |
| Citral 5% | 25.2 | 7.80 | 8.19 | 1.65 | 1.80 | $p<0.05$ | 9191 | 8706 | 3680 | 1.97 | |
| | 22.9 | 10.00 | | | | | 12120 | | | | |
| | 25.8 | 6.78 | | | | | 4808 | | | | |
| Citral 10% | 20.8 | 10.10 | 9.65 | 1.28 | 2.12 | $p<0.01$ | 9937 | 9304 | 1635 | 2.11 | $p<0.01$ |
| | 24.1 | 8.21 | | | | | 7447 | | | | |
| | 26.8 | 10.65 | | | | | 10528 | | | | |
| Citral 15% | 23.1 | 10.32 | 11.22 | 1.31 | 2.47 | $p<0.01$ | 12297 | 12814 | 1290 | 2.91 | $p<0.01$ |
| | 22.0 | 10.62 | | | | | 11863 | | | | |
| | 22.7 | 12.72 | | | | | 14283 | | | | |
| Citral 25% | 21.3 | 10.28 | 13.29 | 2.66 | 2.92 | $p<0.05$ | 18200 | 19426 | 2781 | 4.40 | $p<0.01$ |
| | 21.9 | 14.27 | | | | | 22609 | | | | |
| | 24.7 | 15.33 | | | | | 17469 | | | | |

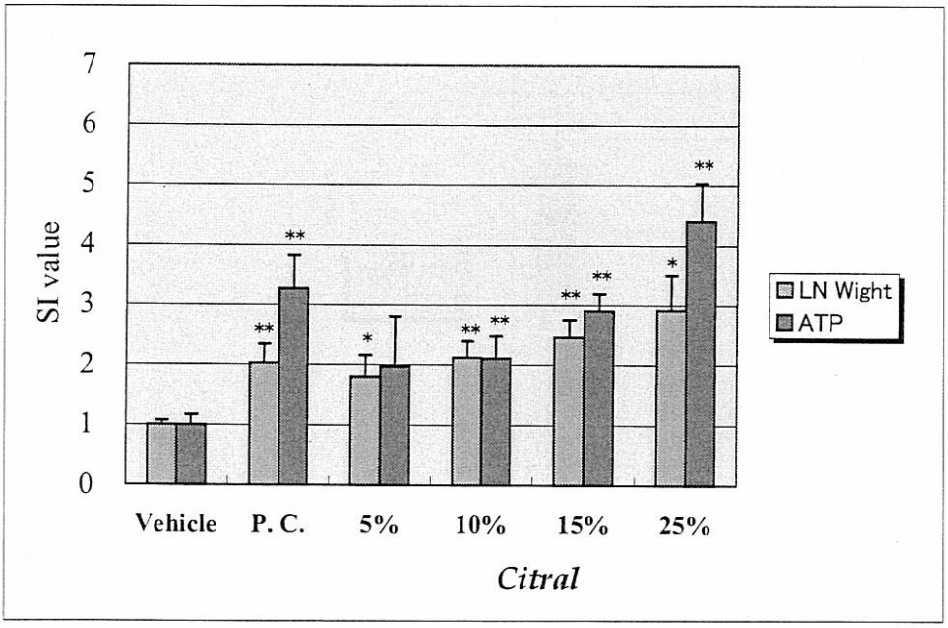



図6-10 DA-LLNA試験におけるCitralのリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p<0.05$、 ** $p<0.01$。Vehicle;AOO溶媒、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。

表6-11 LLNA-DA試験結果 (Imidazolidinyl urea) Vehicle;DMF、P. C. 1;Eugenol 10%/DMF、AOO;acetone/olive oil (4:1, v/v)、P. C. 2;Eugenol 10%/AOO。$p$値は$t$検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。
AOO群はSI値を1とし、P. C. 2はAOO群に対するSI値および$p$値を示した。

投与開始時動物週齢: 10W
投与開始日: 2003年9月3日
摘出・測定日: 2003年9月10日

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | $p$値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | $p$値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 23.9 | 4.28 | 4.03 | 0.55 | 1.00 | - | 4424 | 3428 | 905 | 1.00 | - |
| | 24.4 | 3.98 | | | | | 3087 | | | | |
| | 26.6 | 3.29 | | | | | 2348 | | | | |
| | 26.0 | 4.56 | | | | | 3854 | | | | |
| P. C. 1 | 23.5 | 4.72 | 5.07 | 1.15 | 1.26 | | 5738 | 5813 | 1842 | 1.70 | |
| | 24.0 | 5.23 | | | | | 5644 | | | | |
| | 26.9 | 3.77 | | | | | 3688 | | | | |
| | 26.2 | 6.54 | | | | | 8185 | | | | |
| Imidazolidinyl urea 10% | 24.0 | 5.72 | 5.65 | 0.85 | 1.40 | $p<0.05$ | 7333 | 8084 | 1805 | 2.36 | $p<0.01$ |
| | 27.0 | 4.76 | | | | | 6777 | | | | |
| | 26.9 | 6.46 | | | | | 10143 | | | | |
| Imidazolidinyl urea 25% | 27.6 | 7.17 | 7.41 | 0.22 | 1.84 | $p<0.01$ | 9854 | 11848 | 2027 | 3.46 | $p<0.01$ |
| | 28.0 | 7.60 | | | | | 13907 | | | | |
| | 28.2 | 7.47 | | | | | 11783 | | | | |
| Imidazolidinyl urea 50% | 26.3 | 9.00 | 9.43 | 0.85 | 2.34 | $p<0.01$ | 14760 | 16010 | 1720 | 4.67 | $p<0.01$ |
| | 23.2 | 8.88 | | | | | 15299 | | | | |
| | 23.1 | 10.41 | | | | | 17971 | | | | |
| AOO | 24.5 | 3.01 | 3.39 | 0.39 | 1.00 | - | 2660 | 2580 | 518 | 1.00 | - |
| | 25.6 | 3.71 | | | | | 2856 | | | | |
| | 24.0 | 3.09 | | | | | 1828 | | | | |
| | 25.6 | 3.74 | | | | | 2975 | | | | |
| P. C. 2 | 21.9 | 10.80 | 9.29 | 1.20 | 2.74 | $p<0.01$ | 19298 | 15859 | 3223 | 6.15 | $p<0.01$ |
| | 22.1 | 9.44 | | | | | 17360 | | | | |
| | 22.3 | 9.04 | | | | | 14953 | | | | |
| | 23.6 | 7.89 | | | | | 11827 | | | | |

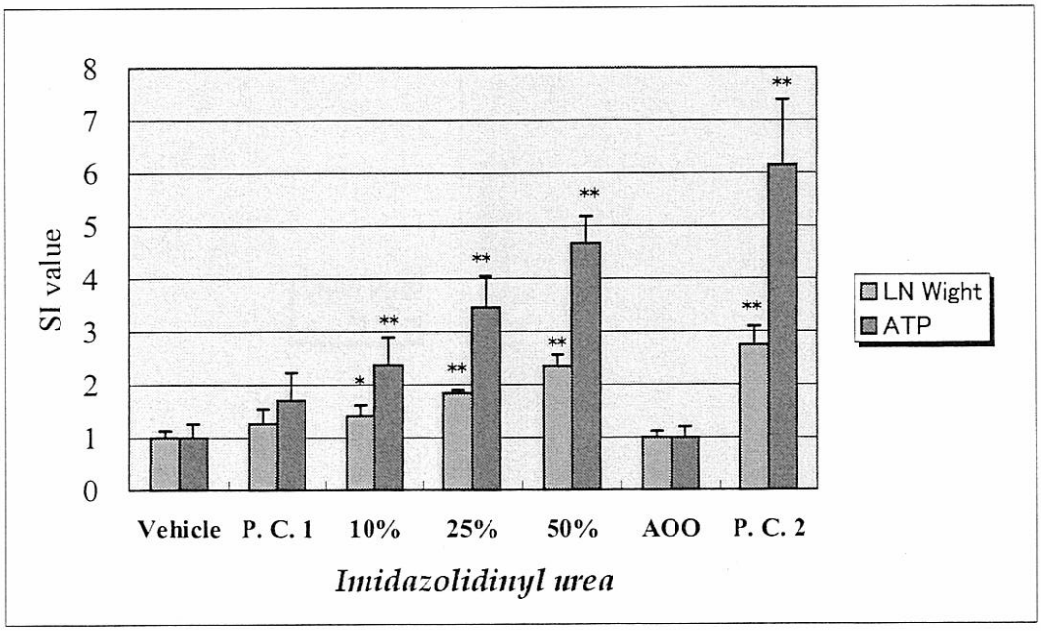



図6-11 DA-LLNA試験におけるImidazolidinyl ureaのリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p<0.05$、 ** $p<0.01$。Vehicle;DMF、P. C. 1;Eugenol 10%/DMF、AOO;acetone/olive oil (4:1, v/v)、P. C. 2;Eugenol 10%/AOO。AOO群はSI=1とし、P. C. 2はAOO群に対するSI値および有意差を示した。

表6-12 LLNA-DA試験結果 (2-Mercaptobenzothiazol、MBT) Vehicle;DMF、P. C. 1;Eugenol 10%/DMF、AOO;acetone/olive oil (4:1, v/v)、P. C. 2;Eugenol 10%/AOO。
$p$値は$t$検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。AOO群はSI値を1とし、P. C. 2はAOO群に対するSI値および$p$値を示した。

| | |
|---|---|
| 投与開始時動物週齢: | 10W |
| 投与開始日: | 2003年9月3日 |
| 摘出・測定日: | 2003年9月10日 |

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | $p$値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | $p$値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 23.9 | 4.28 | 4.03 | 0.55 | 1.00 | - | 4424 | 3428 | 905 | 1.00 | - |
| | 24.4 | 3.98 | | | | | 3087 | | | | |
| | 26.6 | 3.29 | | | | | 2348 | | | | |
| | 26.0 | 4.56 | | | | | 3854 | | | | |
| P. C.1 | 23.5 | 4.72 | 5.07 | 1.15 | 1.26 | | 5738 | 5813 | 1842 | 1.70 | |
| | 24.0 | 5.23 | | | | | 5644 | | | | |
| | 26.9 | 3.77 | | | | | 3688 | | | | |
| | 26.2 | 6.54 | | | | | 8185 | | | | |
| MBT 10% | 25.2 | 4.77 | 4.86 | 0.12 | 1.21 | | 7829 | 6859 | 1111 | 2.00 | $p<0.01$ |
| | 23.9 | 4.81 | | | | | 7102 | | | | |
| | 26.3 | 4.99 | | | | | 5647 | | | | |
| MBT 25% | 26.0 | 5.60 | 4.66 | 0.91 | 1.16 | | 6978 | 4601 | 2283 | 1.34 | |
| | 24.2 | 3.79 | | | | | 2425 | | | | |
| | 23.9 | 4.60 | | | | | 4401 | | | | |
| MBT 50% | 23.6 | 4.73 | 4.69 | 0.06 | 1.17 | | 3976 | 3675 | 889 | 1.07 | |
| | 24.2 | 4.72 | | | | | 4375 | | | | |
| | 23.2 | 4.63 | | | | | 2675 | | | | |
| AOO | 24.5 | 3.01 | 3.39 | 0.39 | 1.00 | - | 2660 | 2580 | 518 | 1.00 | - |
| | 25.6 | 3.71 | | | | | 2856 | | | | |
| | 24.0 | 3.09 | | | | | 1828 | | | | |
| | 25.6 | 3.74 | | | | | 2975 | | | | |
| P. C.2 | 21.9 | 10.80 | 9.29 | 1.20 | 2.74 | $p<0.01$ | 19298 | 15859 | 3223 | 6.15 | $p<0.01$ |
| | 22.1 | 9.44 | | | | | 17360 | | | | |
| | 22.3 | 9.04 | | | | | 14953 | | | | |
| | 23.6 | 7.89 | | | | | 11827 | | | | |

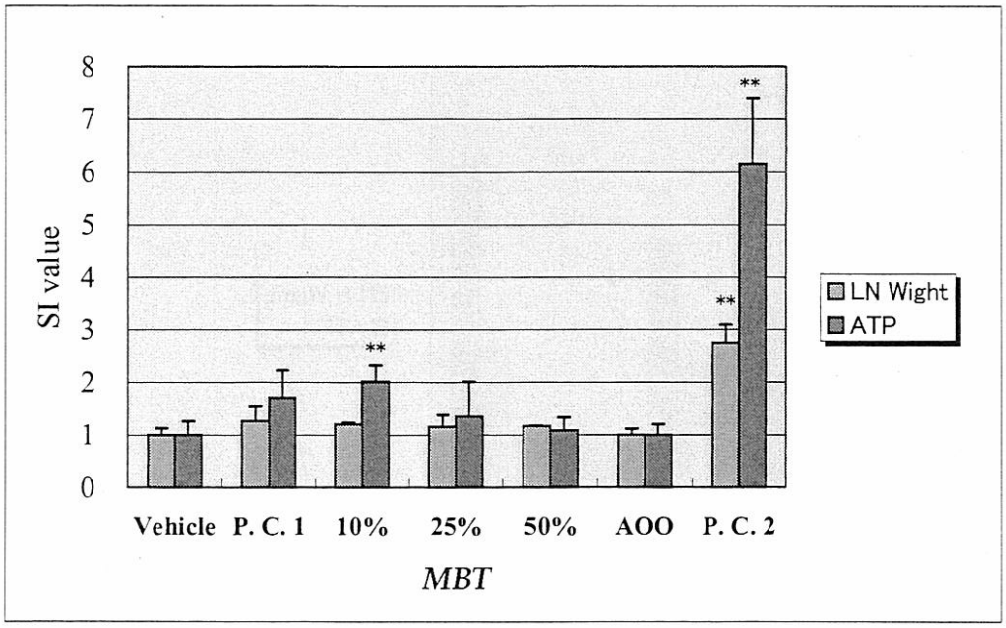



図6-12 DA-LLNA試験における2-Mercaptobenzothiazol(MBT)のリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p<0.05$、 ** $p<0.01$。Vehicle;DMF、P. C. 1;Eugenol 10%/DMF、AOO;acetone/olive oil (4:1, v/v)、P. C. 2;Eugenol 10%/AOO。AOO群はSI=1とし、P. C. 2はAOO群に対するSI値および有意差を示した。

表6-13 LLNA-DA試験結果（$CoCl_2$） Vehicle；DMSO、P. C. 1；Eugenol 10%/DMSO、AOO；acetone/olive oil (4:1, v/v)、P. C. 2；Eugenol 10%/AOO。$p$値は$t$検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。AOO群はSI値を1とし、P. C. 2はAOO群に対するSI値および$p$値を示した。

投与開始時動物週齢： 10W

投与開始日： 2003年8月27日

摘出・測定日： 2003年9月3日

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | $p$値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | $p$値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 20.9 | 4.38 | 5.98 | 1.11 | 1.00 | - | 4770 | 6674 | 1527 | 1.00 | - |
| | 23.9 | 6.09 | | | | | 6914 | | | | |
| | 27.4 | 6.60 | | | | | 8487 | | | | |
| | 23.3 | 6.84 | | | | | 6527 | | | | |
| P. C. 1 | 24.4 | 9.00 | 9.35 | 1.57 | 1.56 | $p<0.05$ | 10887 | 12399 | 2877 | 1.86 | $p<0.05$ |
| | 24.6 | 11.24 | | | | | 16484 | | | | |
| | 21.9 | 7.46 | | | | | 9982 | | | | |
| | 25.3 | 9.68 | | | | | 12245 | | | | |
| $CoCl_2$ 1% | 25.2 | 10.64 | 10.11 | 0.47 | 1.69 | $p<0.01$ | 17709 | 14270 | 2981 | 2.14 | $p<0.01$ |
| | 26.0 | 9.90 | | | | | 12673 | | | | |
| | 26.1 | 9.78 | | | | | 12428 | | | | |
| $CoCl_2$ 2.5% | 23.7 | 11.07 | 11.99 | 0.81 | 2.01 | $p<0.01$ | 17680 | 18117 | 606 | 2.71 | $p<0.01$ |
| | 23.9 | 12.30 | | | | | 17863 | | | | |
| | 23.5 | 12.59 | | | | | 18809 | | | | |
| $CoCl_2$ 5% | 26.1 | 16.58 | 15.61 | 3.18 | 2.61 | $p<0.01$ | 28248 | 24298 | 6013 | 3.64 | $p<0.01$ |
| | 24.6 | 18.19 | | | | | 27268 | | | | |
| | 23.9 | 12.06 | | | | | 17378 | | | | |
| AOO | 22.7 | 3.80 | 3.83 | 0.17 | 1.00 | - | 3529 | 3014 | 436 | 1.00 | - |
| | 24.3 | 4.04 | | | | | 3106 | | | | |
| | 21.7 | 3.85 | | | | | 2949 | | | | |
| | 24.4 | 3.63 | | | | | 2473 | | | | |
| P. C. 2 | 25.3 | 11.21 | 9.59 | 1.35 | 2.50 | $p<0.01$ | 20105 | 15535 | 3114 | 5.15 | $p<0.01$ |
| | 25.7 | 8.46 | | | | | 14663 | | | | |
| | 24.6 | 10.18 | | | | | 14233 | | | | |
| | 25.3 | 8.50 | | | | | 13137 | | | | |

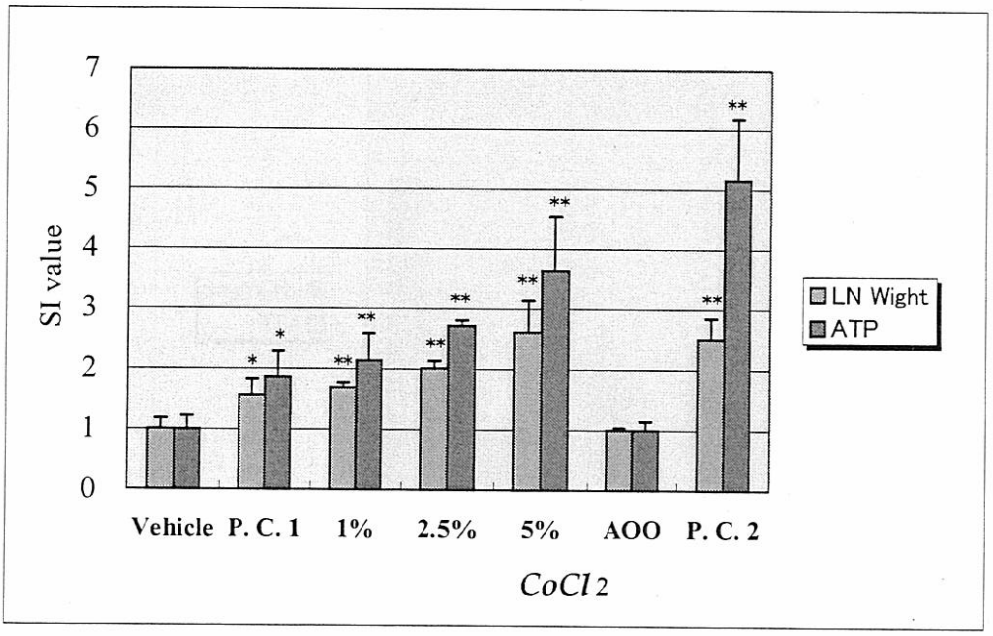



図6-13 DA-LLNA試験における$CoCl_2$のリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p<0.05$、 ** $p<0.01$。Vehicle；DMSO、P. C. 1；Eugenol 10%/DMSO、AOO；acetone/olive oil (4:1, v/v)、P. C. 2；Eugenol 10%/AOO。AOO群はSI=1とし、P. C. 2はAOO群に対するSI値および有意差を示した。

表6-14 LLNA-DA試験結果 ($NiSO_4$) Vehicle;DMSO、P. C. 1;Eugenol 10%/DMSO、AOO;acetone/olive oil (4:1, v/v)、P. C. 2;Eugenol 10%/AOO。$p$値は$t$検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。AOO群はSI値を1とし、P. C. 2はAOO群に対するSI値および$p$値を示した。

| | |
|---|---|
| 投与開始時動物週齢: | 10W |
| 投与開始日: | 2003年8月27日 |
| 摘出・測定日: | 2003年9月3日 |

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | $p$値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | $p$値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 20.9 | 4.38 | 5.98 | 1.11 | 1.00 | - | 4770 | 6674 | 1527 | 1.00 | - |
| | 23.9 | 6.09 | | | | | 6914 | | | | |
| | 27.4 | 6.60 | | | | | 8487 | | | | |
| | 23.3 | 6.84 | | | | | 6527 | | | | |
| P. C.1 | 24.4 | 9.00 | 9.35 | 1.57 | 1.56 | $p<0.05$ | 10887 | 12399 | 2877 | 1.86 | $p<0.05$ |
| | 24.6 | 11.24 | | | | | 16484 | | | | |
| | 21.9 | 7.46 | | | | | 9982 | | | | |
| | 25.3 | 9.68 | | | | | 12245 | | | | |
| $NiSO_4$ 1% | 23.6 | 6.28 | 6.71 | 1.37 | 1.12 | | 7672 | 9098 | 1743 | 1.36 | |
| | 25.3 | 8.24 | | | | | 11041 | | | | |
| | 24.5 | 5.61 | | | | | 8581 | | | | |
| $NiSO_4$ 2.5% | 24.6 | 7.97 | 7.75 | 0.38 | 1.30 | $p<0.05$ | 10829 | 14496 | 6269 | 2.17 | |
| | 22.0 | 7.32 | | | | | 10925 | | | | |
| | 20.3 | 7.97 | | | | | 21735 | | | | |
| $NiSO_4$ 5% | 22.0 | 7.45 | 8.68 | 1.26 | 1.45 | $p<0.05$ | 15969 | 12346 | 3326 | 1.85 | $p<0.05$ |
| | 24.0 | 8.62 | | | | | 9433 | | | | |
| | 23.6 | 9.97 | | | | | 11636 | | | | |
| AOO | 22.7 | 3.80 | 3.83 | 0.17 | 1.00 | - | 3529 | 3014 | 436 | 1.00 | - |
| | 24.3 | 4.04 | | | | | 3106 | | | | |
| | 21.7 | 3.85 | | | | | 2949 | | | | |
| | 24.4 | 3.63 | | | | | 2473 | | | | |
| P. C.2 | 25.3 | 11.21 | 9.59 | 1.35 | 2.50 | $p<0.01$ | 20105 | 15535 | 3114 | 5.15 | $p<0.01$ |
| | 25.7 | 8.46 | | | | | 14663 | | | | |
| | 24.6 | 10.18 | | | | | 14233 | | | | |
| | 25.3 | 8.50 | | | | | 13137 | | | | |

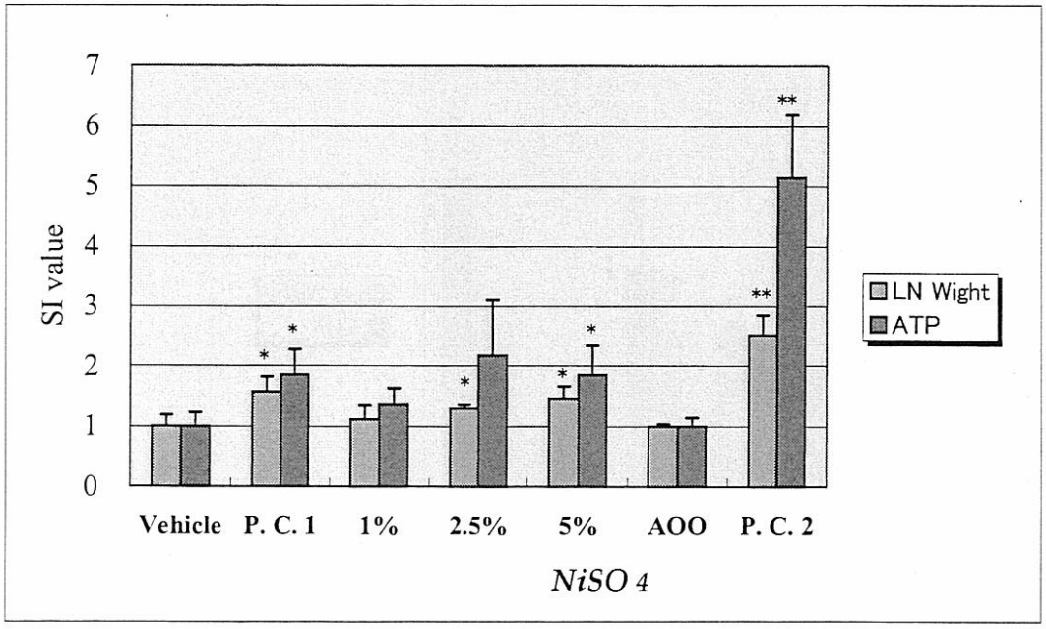



図6-14 DA-LLNA試験における$NiSO_4$のリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p<0.05$、 ** $p<0.01$。Vehicle;DMSO、P. C. 1;Eugenol 10%/DMSO、AOO;acetone/olive oil (4:1, v/v)、P. C. 2;Eugenol 10%/AOO。AOO群はSI=1とし、P. C. 2はAOO群に対するSI値および有意差を示した。

表6-15 LLNA-DA試験結果（Propylparaben） Vehicle；AOO（acetone/olive oil (4:1, v/v)）、P. C. ；Eugenol 10%/AOO。
$p$値は$t$検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

投与開始時動物週齢： 9W
投与開始日： 2003年7月30日
摘出・測定日： 2003年8月6日

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | $p$値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | $p$値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 24.8 | 4.51 | 4.37 | 0.23 | 1.00 | - | 3759 | 3871 | 344 | 1.00 | - |
| | 20.8 | 4.63 | | | | | 3995 | | | | |
| | 21.3 | 4.18 | | | | | 3461 | | | | |
| | 22.5 | 4.17 | | | | | 4269 | | | | |
| P. C. | 22.3 | 9.07 | 10.19 | 1.56 | 2.33 | $p<0.01$ | 16624 | 18535 | 3636 | 4.79 | $p<0.01$ |
| | 25.2 | 12.35 | | | | | 23785 | | | | |
| | 26.4 | 9.01 | | | | | 15667 | | | | |
| | 21.3 | 10.31 | | | | | 18066 | | | | |
| Propylparaben 5% | 22.0 | 4.30 | 4.25 | 0.46 | 0.97 | | 5058 | 4288 | 1095 | 1.11 | |
| | 22.5 | 4.69 | | | | | 4773 | | | | |
| | 22.1 | 3.77 | | | | | 3034 | | | | |
| Propylparaben 10% | 25.2 | 5.37 | 4.51 | 0.76 | 1.03 | | 5539 | 4390 | 1000 | 1.13 | |
| | 23.8 | 3.93 | | | | | 3919 | | | | |
| | 23.3 | 4.22 | | | | | 3713 | | | | |
| Propylparaben 25% | 25.7 | 4.66 | 4.19 | 0.61 | 0.96 | | 6385 | 4959 | 1995 | 1.28 | |
| | 21.8 | 4.42 | | | | | 5813 | | | | |
| | 21.5 | 3.50 | | | | | 2679 | | | | |

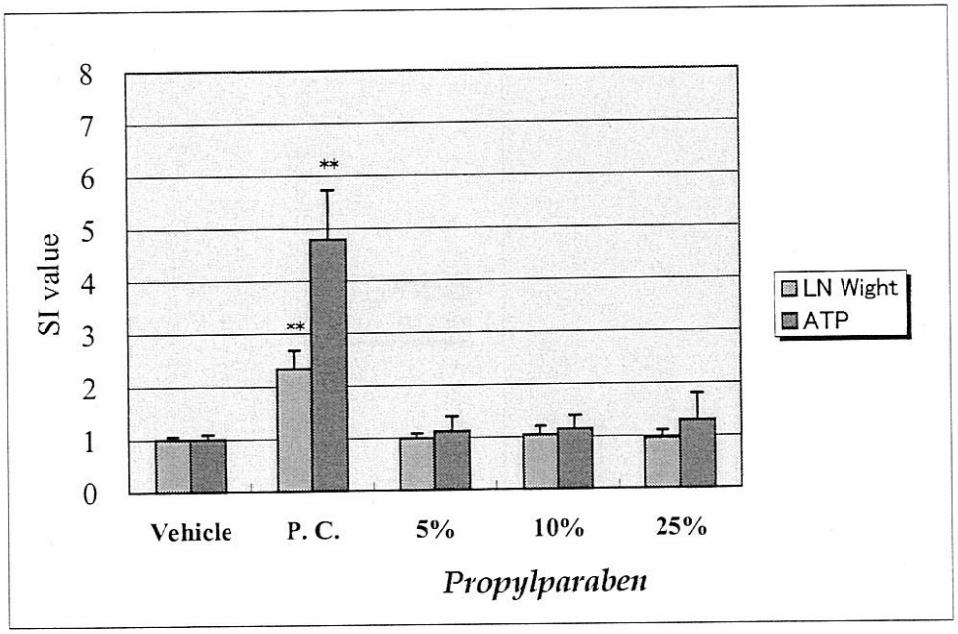



図6-15 DA-LLNA試験におけるPropylparabenのリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p<0.05$、 ** $p<0.01$。Vehicle；AOO、P. C. ；Eugenol 10%/AOO。

表6-16 LLNA-DA試験結果 (Methyl salicylate) Vehicle;AOO(acetone/olive oil (4:1, v/v))、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。
$p$値は$t$検定による。0.05未満のもののみ表に記載した。

| | |
|---|---|
| 投与開始時動物週齢: | 9W |
| 投与開始日: | 2003年7月30日 |
| 摘出・測定日: | 2003年8月6日 |

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | $p$値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | $p$値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 24.8 | 4.51 | 4.37 | 0.23 | 1.00 | - | 3759 | 3871 | 344 | 1.00 | - |
| | 20.8 | 4.63 | | | | | 3995 | | | | |
| | 21.3 | 4.18 | | | | | 3461 | | | | |
| | 22.5 | 4.17 | | | | | 4269 | | | | |
| P. C. | 22.3 | 9.07 | 10.19 | 1.56 | 2.33 | $p<0.01$ | 16624 | 18535 | 3636 | 4.79 | $p<0.01$ |
| | 25.2 | 12.35 | | | | | 23785 | | | | |
| | 26.4 | 9.01 | | | | | 15667 | | | | |
| | 21.3 | 10.31 | | | | | 18066 | | | | |
| Methyl salicylate 5% | 21.2 | 4.57 | 4.20 | 0.49 | 0.96 | | 3250 | 2773 | 878 | 0.72 | |
| | 23.0 | 4.38 | | | | | 3310 | | | | |
| | 20.1 | 3.64 | | | | | 1760 | | | | |
| Methyl salicylate 10% | 24.1 | 4.89 | 4.92 | 0.49 | 1.13 | | 4499 | 3723 | 1464 | 0.96 | |
| | 22.8 | 5.43 | | | | | 4637 | | | | |
| | 23.0 | 4.45 | | | | | 2035 | | | | |
| Methyl salicylate 25% | 25.9 | 4.56 | 5.14 | 0.57 | 1.18 | | 4542 | 4661 | 732 | 1.20 | |
| | 24.6 | 5.69 | | | | | 5445 | | | | |
| | 23.1 | 5.17 | | | | | 3996 | | | | |

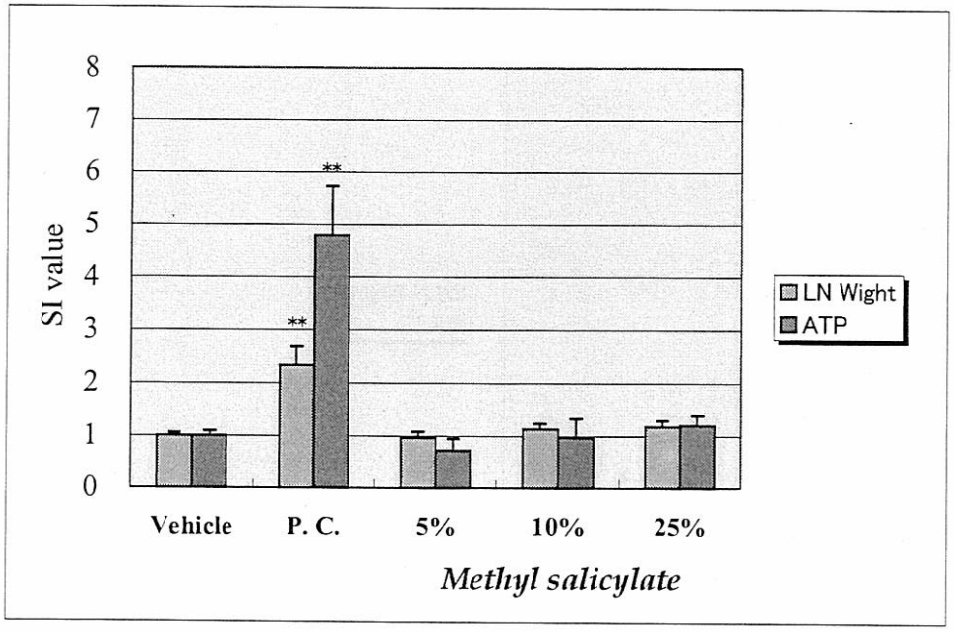



図6-16 DA-LLNA試験におけるMethyl salicylateのリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.、* $p<0.05$、 ** $p<0.01$。Vehicle;AOO、P. C. ;Eugenol 10%/AOO。

表6-17 LLNA-DA試験結果（Benzalkonium chloride、BzC） Vehicle；AOO溶媒（acetone/olive oil (4:1, v/v)）、P. C. ；Eugenol 10%/AOO。
Vehicle群の1匹が麻酔操作のミスにより死亡しn=2となったため、有意差検定は行わなかった。

投与開始時動物週齢： 10W
投与開始日： 2003年8月20日
摘出・測定日： 2003年8月27日

| | 体重 (g) | リンパ節重量 (mg) | 平均 (mg) | 標準偏差 (mg) | SI値 | *p*値 | ATP発光量 (RLU) | 平均 (RLU) | 標準偏差 (RLU) | SI値 | *p*値 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 26.2 | 4.24 | 4.01 | 0.33 | 1.00 | - | 6677 | 4677 | 2827 | 1.00 | - |
| | 26.2 | 3.77 | | | | | 2678 | | | | |
| | 死亡 | - | | | | | - | | | | |
| P. C. | 23.4 | 10.55 | 8.98 | 1.51 | 2.24 | *N. D.* | 17961 | 17452 | 2698 | 3.73 | *N. D.* |
| | 22.0 | 8.84 | | | | | 19860 | | | | |
| | 24.8 | 7.54 | | | | | 14536 | | | | |
| BzC 1% | 25.4 | 8.83 | 8.20 | 1.59 | 2.05 | *N. D.* | 20827 | 22429 | 7040 | 4.80 | *N. D.* |
| | 24.9 | 9.38 | | | | | 30132 | | | | |
| | 23.2 | 6.40 | | | | | 16329 | | | | |
| BzC 2.5% | 25.0 | 9.41 | 10.42 | 0.90 | 2.60 | *N. D.* | 21150 | 18058 | 3869 | 3.86 | *N. D.* |
| | 25.2 | 10.73 | | | | | 19305 | | | | |
| | 24.6 | 11.12 | | | | | 13719 | | | | |
| BzC 5% | 24.4 | 9.11 | 8.95 | 0.22 | 2.23 | *N. D.* | 8840 | 8942 | 1126 | 1.91 | *N. D.* |
| | 20.6 | 9.04 | | | | | 10115 | | | | |
| | 24.1 | 8.70 | | | | | 7871 | | | | |

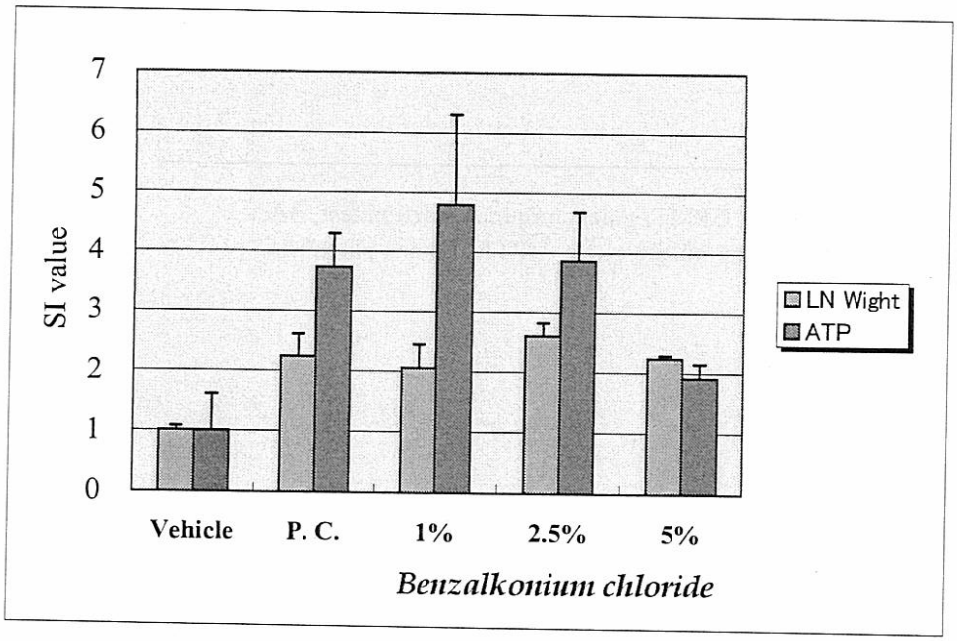



図6-17 DA-LLNA試験におけるBenzalkonium chlorideのリンパ節重量およびATP量の増加率。
値は平均±S. D.。Vehicle；AOO溶媒、P. C. ；Eugenol 10%/AOO。

表6-18 17検体の判定結果のまとめおよび他の試験結果との比較

| Chemical name | LLNA-DA | LLNA | GPMT/BA | HMT | HPTA |
|---|---|---|---|---|---|
| DNCB | + | + | + | | |
| pPDA | + | + | + | + | + |
| Trimelitic anhydride | + | + | + | | |
| Cinnamic aldehyde | + | + | + | + | + |
| Isoeugenol | + | + | + | | + |
| Eugenol | + | + | + | | + |
| Benzocaine | + | +/− | + | +/− | |
| Abietic acid | + | + | + | | + |
| HCA | + | + | + | | |
| Citral | + | + | + | + | |
| Imidazolidinyl urea | + | + | + | | + |
| MBT | − | + | + | + | + |
| CoCl2 | + | + | + | + | + |
| NiSO4 | − | − | + | + | + |
| Propyl paraben | − | − | − | +/− | + |
| Methyl salicylate | − | − | − | − | |
| Benzalkonium chloride | + | − | − | | + |

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

表6-19 $EC_3$のまとめ LLNA-DAのATP発光量を指標としたSI値より求めた$EC_3$はLLNAの$EC_3$(文献値)とほぼ一致する。

| Chemicals | Vehicle | $EC_3$ value (LLNA-DA) | $EC_3$ value (LLNA) | GPMT [6] |
|---|---|---|---|---|
| 2,4-Dinitrochlorobenzene | AOO | 0.05% | 0.03～0.09% [1)2)5)] | Extreme |
| *p*-Phenylenediamine | AOO | 0.35% | 0.06～0.20% [1)3)] | Extreme |
| Trimellitic anhydride | AOO | 0.20% | <2.5% [6)] | Moderate |
| Cinnamic aldehyde | AOO | 2.98% | 1.7% [4)]、2.0% [1)] | Extreme |
| Isoeugenol | AOO | 2.46%、2.28%、3.40% | 1.3～3.3% [1)5)] | Extreme |
| Eugenol | AOO | 4.23%、5.09%、5.59% | 5.8～14.5% [1)5)] | Moderate |
| Benzocaine | AOO | 6.57% | negative [6)7)]、+/− [2)] | Moderate |
| Abietic acid | AOO | 7.90% | 3.13% [6)] | Moderate |
| Hexyl cinnamic aldehyde | AOO | 11.6% | 4.0～11.9% [1)2)5)] | Moderate [9)] |
| Citral | AOO | 15.6% | 13% [1)] | Moderate |
| Imidazolidinyl urea | DMF | 18.8% | 23.9% [6)] | Strong |
| 2-Mercaptobenzothiazol | DMF | negative | <10 [6)] | Strong |
| $CoCl_2$ | DMSO | 3.27% | 0.82% [8)] | Extreme |
| $NiSO_4$ | DMSO | negative | negative [2)8)] | Moderate |
| Propyl paraben | AOO | negative | >50% [1)], negative [2)] | Non-sensitizer |
| Methyl salicylate | AOO | negative | negative [2)6)] | Non-sensitizer |

表6-19の引用文献


1) Basketter, *et al.*, *Contact Dermatitis* (2000) **42**, 344-348.
2) Haneke, *et al.*, *Reg. Toxicol. Pharmacol.* (2001) **34**, 274-286.
3) Warbrick, *et al.*, *J. Appl. Toxicol.* (1999) **19**, 255-260.
4) Wright , *et al.*, *Int. J. Cosmet. Sci.* (2001) **23**, 75-83.
5) Loveless, *et al.*, *Toxicol.* (1996) **108**, 141-152.
6) Basketter, *et al.*, *Fd. Chem. Toxicol.* (1992) **30**, 65-69.
7) Suda, *et al.*, *J. Toxicol. Sci.* (2002) **27**, 205-218.
8) Ikarashi, *et al.*, *Toxicol.* (1992) **76**, 283-292.
9) Cronin, *et al.*, *SAR QSAR Environ. Res.* (1994) **2**, 159-179.

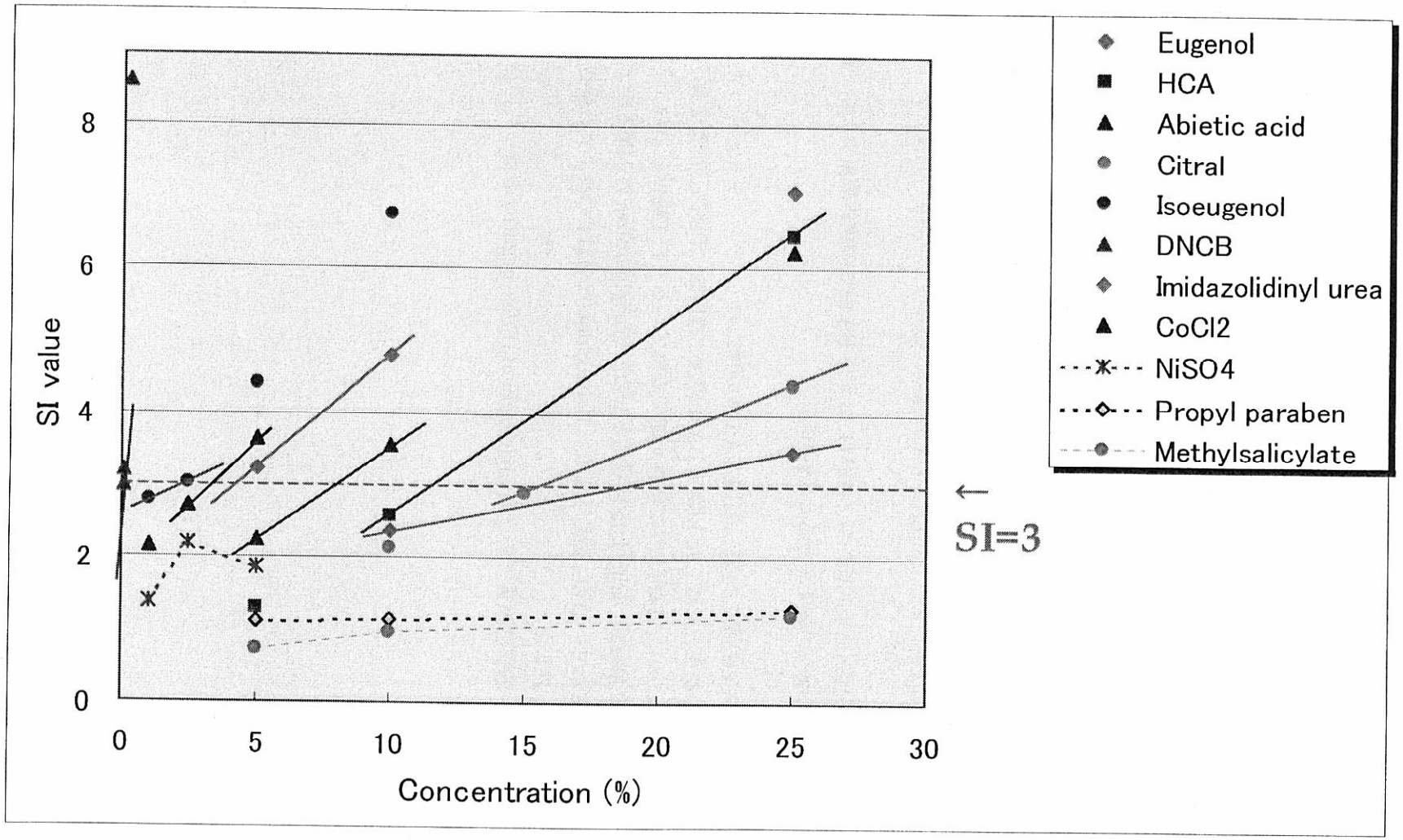



**図6-18 SI値-用量プロット** 主な被験物質のATP発光量を指標としたSI値を用量に対してプロットした。外挿した直線とSI=3の交点が$EC_3$を表す。

## 資料７）LLNA-DA の感度、特異性、予測性、精度

—試験法の感度，特異性，予測性，精度（一致率）を記載した資料

### 7-1　LLNA の結果と比較した LLNA-DA の検出力

LLNA の結果と比較した LLNA-DA の感度（Sensitivity）、特異性（Specificity）、予測性（Positive Predictivity、Negative Predictivity）、精度（Accuracy）を表 7-1 に纏めた。Benzocaine の LLNA の評価結果は一貫性が無く±とされているため、対象から外した。

いずれも 75%以上の値となっている。特異性および陰性予測性については、今後 LLNA 陰性の検体数を増やす必要があると思われる。

### 7-2　GPMT および BA の結果と比較した LLNA-DA の検出力

GPMT および BA の結果と比較した LLNA-DA の感度、特異性、予測性、精度を表 7-2 に纏めた。

特異性および陰性予測性が比較的低いが、GPMT および BA 陰性の検体数が少なく、正確な評価のためには今後増やす必要があると思われる。

### 7-3　HMT および HPTA の結果と比較した LLNA-DA の検出力

HMT および HPTA の結果と比較した LLNA-DA の感度、特異性、予測性、精度を表 7-3 に纏めた。ヒトのデータについては何れかで陽性が報告されているものを陽性とした。HMT で陰性が報告されている Methyl salicylate は陰性とした。Propylparaben は HMT で±であるが、HPTA で＋とされているので陽性とした。Benzocaine は HMT のみで±と報告されているため、対象から外した。

金属塩の$NiSO_4$、弱い感作性物質であるPropylparabenはFalse negativeとなっている。

表7-1 LLNA-DAの検出力(対LLNA)

| | | LLNA | |
|---|---|---|---|
| | | Positive | Negative |
| LLNA-DA | Positive | DNCB<br>pPDA<br>Cinnamaldehyde<br>Isoeugenol<br>Eugenol<br>Abietic acid<br>HCA<br>Citral<br>Imidazolidinyl urea<br>$CoCl_2$<br>Trimellitic anhydride<br>11chemicals | Benzalkonium chloride<br>1chemicals |
| | Negative | MBT<br>1chemicals | $NiSO_4$<br>Propyl paraben<br>Methyl salicylate<br>3chemicals |

| Comparison | No. of comparisons | Sensitivity | Specificity | Positive Predictivity | Negative Predictivity | Accuracy |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LLNA-DA vs LLNA | 16 | 92%<br>( 11 / 12 ) | 75%<br>( 3 / 4 ) | 92%<br>( 11 / 12 ) | 75%<br>( 3 / 4 ) | 88%<br>( 14 / 16 ) |

表7-2 LLNA-DAの検出力(対GPMT/BA)

| | | GPMT/BA | |
|---|---|---|---|
| | | Positive | Negative |
| LLNA-DA | Positive | DNCB<br>pPDA<br>Cinnamaldehyde<br>Isoeugenol<br>Eugenol<br>Abietic acid<br>HCA<br>Citral<br>Imidazolidinyl urea<br>$CoCl_2$<br>Benzocaine<br>Trimellitic anhydride<br>12chemicals | Benzalkonium chloride<br>1chemicals |
| | Negative | MBT<br>$NiSO_4$<br>2chemicals | Propyl paraben<br>Methyl salicylate<br>2chemicals |

| Comparison | No. of comparisons | Sensitivity | Specificity | Positive Predictivity | Negative Predictivity | Accuracy |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LLNA-DA vs GPMT/BA | 17 | 86%<br>( 12 / 14 ) | 67%<br>( 2 / 3 ) | 92%<br>( 12 / 13 ) | 50%<br>( 2 / 4 ) | 82%<br>( 14 / 17 ) |

GPMT;guinea pig maximization test
BA;Buehler assay

表7-3 LLNA-DAの検出力(対HMT/HPTA)

| | | HMT/HPTA | |
|---|---|---|---|
| | | Positive | Negative |
| LLNA-DA | Positive | 9chemicals<br>pPDA<br>Cinnamaldehyde<br>Isoeugenol<br>Eugenol<br>Abietic acid<br>Benzalkonium chloride<br>Citral<br>Imidazolidinyl urea<br>$CoCl_2$ | 0chemicals |
| | Negative | 3chemicals<br>MBT<br>$NiSO_4$<br>Propyl paraben | 1chemicals<br>Methyl salicylate |

| Comparison | No. of comparisons | Sensitivity | Specificity | Positive Predictivity | Negative Predictivity | Accuracy |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LLNA-DA vs HMT/HPTA | 13 | 75%<br>( 9 / 12 ) | 100%<br>( 1 / 1 ) | 100%<br>( 9 / 9 ) | 25%<br>( 1 / 4 ) | 77%<br>( 10 / 13 ) |

HMT;human maximization test
HPTA;human patch test allergen

## 資料８）LLNA-DA の特徴

—試験法の特徴（適用範囲，false positive，false negative）

### 8-1　LLNA-DA の適用範囲、False positive、False negative

LLNA-DA はLLNA のエンドポイントの変更であるから、その適用範囲は原則的にLLNA と同等と考えられる。

即ち、LLNA-DA で使用可能な Vehicle を用いた溶液または懸濁液として、マウス耳介に投与可能なあらゆる物質が評価可能である。guinea pig を用いる方法は感作誘発期の皮膚反応を評価するため、着色したサンプルのなかには評価が困難なものもあるが、LLNA-DA には適用可能である。

LLNA で検出できない弱い感作性物質および一部の金属は、リンパ球増殖活性が充分でない事を意味しているため、LLNA-DA でも同様に False negative となると予想される。同様に、LLNA で陽性となる幾つかの強い刺激性物質は、LLNA-DA でも False positive となると予想される。

LLNAと比較した場合、SI=3 を示す濃度（$EC_3$）がよく一致する事から、検出感度はほぼ同等と予想される。ただし、判定が微妙な被験物質の中には、結果が異なるという事も起こり得る。

今回の 17 検体の評価結果では、LLNAに対してはMBTがFalse negative、Benzalkonium chlorideがFalse positiveであった。GPMT/BAに対しては、MBTおよび$NiSO_4$がFalse negative、Benzalkonium chlorideがFalse positiveであった。HMT/HPTAに対しては、MBTおよび$NiSO_4$、Propyl parabenがFalse negative、False positiveは無かった。

### 8-2　SI 値の再現性

陽性対照物質として用いている 10%Eugenol/AOO の SI 値のヒストリカルデータを図 8-1 に示した。リンパ節重量、ATP 発光量ともに、SI 値は一定レベルの値を示しており、再現性がある。

### 8-3　$EC_3$の再現性

3 回の独立した試験を行ったEugenolおよびIsoeugenolの評価結果を表 8-1-1 および表 8-1-2 に纏めた。SI値を指標とした$EC_3$にはそれぞれ再現性が認められる。

### 8-4　4 回目の投与日の比較

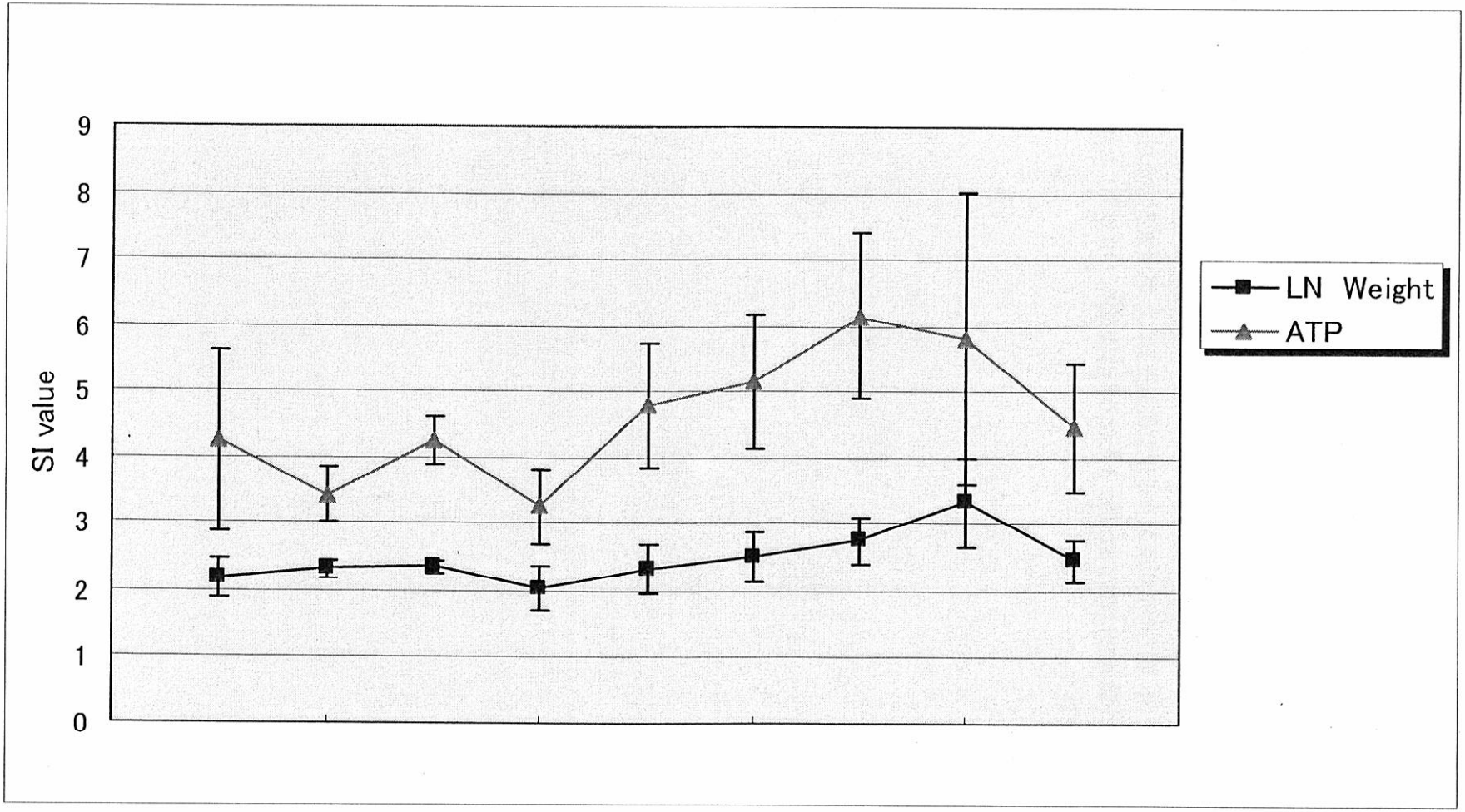
EugenolのExp. 2 は、比較のためにDay6 に 4 回目の投与を行っている。Exp. 1 、Exp. 3 と比較して、SI値はいずれも最も低い値であり、$EC_3$は最も高い値となった。しかしその差はばらつきの範囲内と考えられる。

Day6 に 4 回目の投与を行ってもほぼ同等の結果が得られると予想されるものの、Day7

の方がより望ましい（実績数が多いため）。

8-5　高用量域での ATP 測定値のばらつき

Isoeugenol　Exp. 1 では、25%および 50%投与群で、ATP 測定値のばらつきが見られた。この例に限らず、リンパ節重量が 20mg を超えるような場合は、組織の懸濁に用いる PBS の量が 500μL であるため懸濁液が均一とならずに ATP 測定値がばらつく危険性がある。組織の懸濁に用いる PBS 量を増やせばより正確な値を得ることが出来ると予想される。しかしながらこのような用量域では通常 SI 値は 3 をはるかに上回る（10 以上）ため、試験の判定の上では重要ではない。




Data presented as mean ± S. D.

**図8-1 SI値の再現性** 10%Eugenol/AOOについて、独立した9回の試験におけるリンパ節重量(LN Weight)とATPのSI値を、AOO群を1として示した。

**表8-1-1 IsoeugenolのEC$_3$の再現性** Isoeugenolについて、独立した3回のLLNA-DAによる結果を纏めた。EC$_3$はATP発光量を指標として求めた。

| Concentration(%) | SI value (ATP) ± S.D. | | |
|---|---|---|---|
| | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 |
| Vehicle (AOO) | 1.00 ± 0.54 | 1.00 ± 0.54 | 1.00 ± 0.30 |
| 0.5 | 1.50 ± 0.54 | | 1.22 ± 0.13 |
| 1 | 2.28 ± 0.60 | | 2.77 ± 1.01 |
| 2.5 | 2.78 ± 0.17 | 3.11 ± 1.15 | 3.01 ± 0.98 |
| 5 | 3.39 ± 0.69 | 4.39 ± 1.25 | |
| 10 | 5.68 ± 1.19 | 6.77 ± 0.23 | |
| **EC$_3$** | **3.40%** | **2.28%** | **2.46%** |

**表8-1-2 EugenolのEC$_3$の再現性** Eugenolについて、独立した3回のLLNA-DAによる結果を纏めた。EC$_3$はATP発光量を指標として求めた。

| Concentration(%) | SI value (ATP) ± S.D. | | |
|---|---|---|---|
| | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 |
| Vehicle (AOO) | 1.00 ± 0.17 | 1.00 ± 0.17 | 1.00 ± 0.09 |
| 5 | 2.92 ± 1.00 | 2.80 ± 1.08 | 3.24 ± 0.70 |
| 10 | 7.35 ± 2.62 | 4.47 ± 0.98 | 4.79 ± 0.94 |
| 25 | 10.92 ± 3.63 | 5.62 ± 3.20 | 7.07 ± 0.44 |
| **EC$_3$** | **5.09%** | **5.59%** | **4.23%** |

添付資料 6

# OECD 429
# OECD GUIDELINE FOR THE TESTING CHEMICALS
## Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay

Adopted:
24th April 2002

# OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

## Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay

### INTRODUCTION

1. The OECD Test Guideline Programme periodically reviews progress in test method development and refinement, both in terms of scientific advances and animal welfare, to determine whether existing Test Guidelines should be updated and whether new Guidelines should be developed. Toward that end, a new assay for the determination of skin sensitisation in the mouse, the Local Lymph Node Assay (LLNA) has been sufficiently validated and accepted to justify its adoption as a new Test Guideline (1)(2)(3). This is the second Guideline to be promulgated for assessing skin sensitisation potential of chemicals in animals. The other Guideline (406) utilises guinea pig tests, notably the guinea pig maximisation test and the Buehler test (4).

2. The LLNA provides certain advantages with regard to both scientific progress and animal welfare. It studies the induction phase of skin sensitisation and provides quantitative data suitable for dose response assessment. The details of the validation of the LLNA and a review of the associated work have been published (5)(6)(7)(8). In addition, it should be noted that the mild/moderate sensitisers, which are recommended as suitable positive control substances for guinea pig test methods, are also appropriate for use with the LLNA (6)(8)(9).

### INITIAL CONSIDERATIONS

3. The LLNA provides an alternative method for identifying skin sensitising chemicals and for confirming that chemicals lack a significant potential to cause skin sensitisation. This does not necessarily imply that in all instances the LLNA should be used in place of guinea pig tests, but rather that the assay is of equal merit and may be employed as an alternative in which positive and negative results generally no longer require further confirmation.

4. The LLNA is an *in vivo* method and, as a consequence, will not eliminate the use of animals in the assessment of contact sensitising activity. It has, however, the potential to reduce the number of animals required for this purpose. Moreover, the LLNA offers a substantial refinement of the way in which animals are used for contact sensitisation testing. The LLNA is based upon consideration of immunological events stimulated by chemicals during the induction phase of sensitisation. Unlike guinea pig tests the LLNA does not require that challenged-induced dermal hypersensitivity reactions be elicited. Furthermore, the LLNA does not require the use of an adjuvant, as is the case for the guinea pig maximisation test. Thus, the LLNA reduces animal distress. Despite the advantages of the LLNA over traditional guinea pig tests, it should be recognised that there are certain limitations that may necessitate the use of traditional guinea pigs tests (e.g., false negative findings in the LLNA with certain metals, false positive findings with certain skin irritants)(10).

## PRINCIPLE OF THE TEST

5. The basic principle underlying the LLNA is that sensitisers induce a primary proliferation of lymphocytes in the lymph node draining the site of chemical application. This proliferation is proportional to the dose applied (and to the potency of the allergen) and provides a simple means of obtaining an objective, quantitative measurement of sensitisation. The LLNA assesses this proliferation as a dose-response in which the proliferation in test groups is compared to that in vehicle treated controls. The ratio of the proliferation in treated groups to that in vehicular controls, termed the Stimulation Index, is determined, and must be at least three before a test substance can be further evaluated as a potential skin sensitiser. The methods described here are based on the use of radioactive labelling to measure cell proliferation. However, other endpoints for assessment of proliferation may be employed provided there is justification and appropriate scientific support, including full citations and description of the methodology.

## DESCRIPTION OF THE ASSAY

### Selection of animal species

6. The mouse is the species of choice for this test. Young adult female mice of CBA/Ca or CBA/J strain, which are nulliparous and non-pregnant, are used. At the start of the study, animals should be between 8-12 weeks old, and the weight variation of the animals should be minimal and not exceed 20% of the mean weight. Other strains and males may be used when sufficient data are generated to demonstrate that significant strain and/or gender-specific differences in the LLNA response do not exist.

## HOUSING AND FEEDING CONDITIONS

7. Animals should be individually housed. The temperature of the experimental animal room should be 22°C (± 3°C). Although the relative humidity should be at least 30% and preferably not exceed 70% other than during room cleaning, the aim should be 50-60%. Lighting should be artificial, the sequence being 12 hours light, 12 hours dark. For feeding, conventional laboratory diets may be used with an unlimited supply of drinking water.

## PREPARATION OF ANIMALS

8. The animals are randomly selected, marked to permit individual identification (but not by any form of ear marking), and kept in their cages for at least 5 days prior to the start of dosing to allow for acclimatisation to the laboratory conditions. Prior to the start of treatment all animals are examined to ensure that they have no observable skin lesions.

### Reliability check

9. Positive controls are used to demonstrate appropriate performance of the assay and competency of the laboratory to successfully conduct the assay. The positive control should produce a positive LLNA response at an exposure level expected to give an increase in the stimulation index (SI) >3 over the negative control group. The positive control dose should be chosen such that the induction is clear but not excessive. Preferred substances are hexyl cinnamic aldehyde (CAS No 101-86-0) and mercaptobenzothiazole (CAS No 149-30-4). There may be circumstances in which, given adequate justification, other control substances, meeting the above criteria, may be used. While ordinarily a positive control group may be required in each assay, there may be situations in which test laboratories will have available historic positive control data to show consistency of a satisfactory response over a six-month or

more extended period. In those situations, less frequent testing with positive controls may be appropriate at intervals of no greater than 6 months. Although the positive control substance should be tested in the vehicle that is known to elicit a consistent response (e.g., acetone:olive oil), there may be certain regulatory situations in which testing in a non-standard vehicle (clinically/chemically relevant formulation) will also be necessary. In such situations the possible interaction of a positive control with this unconventional vehicle should be tested.

## TEST PROCEDURE

### Number of animals and dose levels

10. A minimum of four animals is used per dose group, with a minimum of three concentrations of the test substance, plus a negative control group treated only with the vehicle for the test substance, and a positive control, as appropriate. In those cases in which individual animal data are to be collected, a minimum of five animals per dose group are used. Dose and vehicle selection should be based on the recommendations given in reference (2). Doses are selected from the concentration series 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5% etc. Existing acute toxicity and dermal irritation data should be considered, where available, in selecting the three consecutive concentrations so that the highest concentration maximises exposure whilst avoiding systemic toxicity and excessive local skin irritation (2)(11). Except for absence of treatment with the test substance, animals in the control groups should be handled and treated in a manner identical to that of animals in the treatment groups.

11. The vehicle should be selected on the basis of maximising the test concentrations and solubility whilst producing a solution/suspension suitable for application of the test substance. In order of preference, recommended vehicles are acetone/olive oil (4:1 v/v), dimethylformamide, methyl ethyl ketone, propylene glycol and dimethyl sulphoxide (2)(10), but others may be used if sufficient scientific rationale is provided. In certain situations it may be necessary to use a clinically relevant solvent or the commercial formulation in which the test substance is marketed as an additional control. Particular care should be taken to ensure that hydrophilic materials are incorporated into a vehicle system, which wets the skin and does not immediately run off. Thus, wholly aqueous vehicles are to be avoided.

### Experimental schedule

12. The experimental schedule of the assay is as follows:

- *Day 1:*
  Individually identify and record the weight of each animal. Open application of 25µL of the appropriate dilution of the test substance, the vehicle alone, or the positive control (as appropriate), to the dorsum of each ear.
- *Days 2 and 3:*
  Repeat the application procedure carried out on day 1.
- *Days 4 and 5* :
  No treatment.
- *Day 6* :
  Record the weight of each animal. Inject 250µL of phosphate-buffered saline (PBS) containing 20 µCi (7.4e+5 Bq) of $^{3}$H-methyl thymidine into all test and control mice via the tail vein. Alternatively inject 250 µL PBS containing 2 µCi (7.4e + 4 Bq) of $^{125}$I-iododeoxyuridine and $10^{-5}$M fluorodeoxyuridine into all mice via the tail vein. Five hours (5 h) later, the animals are killed. The draining auricular lymph nodes from each ear are excised and pooled in PBS for each experimental group (pooled treatment group approach);

alternatively pairs of lymph nodes from individual animals may be excised and pooled in PBS for each animal (individual animal approach). Details and diagrams of the node identification and dissection can be found in Annex I of the ICCVAM Immunotoxicology Working Group LLNA Protocol (10).

**Preparation of cell suspensions**

13. A single cell suspension of lymph node cells (LNC) either from pooled treatment groups or bilaterally from individual animals is prepared by gentle mechanical disaggregation through 200 µm-mesh stainless steel gauze. Lymph node cells are washed twice with an excess of PBS and precipitated with 5% trichloroacetic acid (TCA) at 4°C for 18h(2). Pellets are either re-suspended in 1 mL TCA and transferred to scintillation vials containing 1.0 mL of scintillation fluid for $^{3}$H-counting, or transferred directly to gamma counting tubes for $^{125}$I-counting.

**Determination of cellular proliferation (incorporated radioactivity)**

14. Incorporation of $^{3}$H-methyl thymidine is measured by β-scintillation counting as disintegrations per minute (DPM). Incorporation of $^{125}$I-iododeoxyuridine is measured by $^{125}$I-counting and also is expressed as DPM. Depending on the approach used, the incorporation will be expressed as DPM/treatment group (pooled approach) or DPM/animal (individual approach).

## OBSERVATIONS

**Clinical observations**

15. Animals should be carefully observed once daily for any clinical signs, either of local irritation at the application site or of systemic toxicity. All observations are systematically recorded with individual records being maintained for each animal.

**Body weights**

16. As stated in paragraph 12, individual animal body weights should be measured at the start of the test and at the scheduled kill of the animals.

## CALCULATION OF RESULTS

17. Results are expressed as the Stimulation Index (SI). When using the pooled approach, the SI is obtained by dividing the pooled radioactive incorporation for each treatment group by the incorporation of the pooled vehicle control group; this yields a mean SI. When using the individual approach, the SI is derived by dividing the mean DPM /mouse within each test substance group and the positive control group by the mean DPM/mouse for the solvent/vehicle control group. The average SI for vehicle treated controls is then 1.

18. Use of the individual approach to calculate the SI will enable the performance of a statistical analysis of the data. In choosing an appropriate method of statistical analysis, the investigator should maintain an awareness of possible inequalities of variances and other related problems that may necessitate a data transformation or a non-parametric statistical analysis. An adequate approach for interpreting the

data is to evaluate all individual data of treated and vehicle controls, and derive from these the best fitting dose response curve, taking confidence limits into account (10)(12)(13). However, the investigator should be alert to possible "outlier" responses for individual animals within a group that may necessitate the use of an alternative measure of response (e.g. median rather than mean) or elimination of the outlier.

19. The decision process with regard to a positive response includes a stimulation index ≥ 3, together with consideration of dose-response and, where appropriate, statistical significance (3)(6)(10)(13)(14).

20. If it is necessary to clarify the results obtained, consideration should be given to various properties of the test substance, including whether it has a structural relationship to known skin sensitisers, whether it causes excessive skin irritation, and the nature of the dose response seen. These and other considerations are discussed in detail elsewhere (7).

## DATA AND REPORTING

### Data

21. Data should be summarised in tabular form showing the mean and individual DPM values and stimulation indexes for each dose (including vehicle control) group.

### Test report

22. The test report should contain the following information:

Test substance:

- identification data (e.g. CAS number, if available; source; purity; known impurities; lot number);
- physical nature and physicochemical properties (e.g. volatility, stability, solubility);
- if mixture, composition and relative percentages of components.

Vehicle:

- identification data (purity; concentration, where appropriate; volume used);
- justification for choice of vehicle.

Test animals:

- strain of mice used;
- microbiological status of the animals, when known;
- number, age and sex of animals;
- source of animals, housing conditions, diet, etc.

Test conditions:

- details of test substance preparation and application;
- justification for dose selection (including results from range finding study, if conducted);- vehicle and test substance concentrations used, and total amount of substance applied;
- details of food and water quality (including diet type/source, water source).

Reliability check:

- a summary of results of latest reliability check, including information on substance, concentration and vehicle used;
- concurrent and/or historical positive and negative control data for testing laboratory.

Results:

- individual weights of animals at start of dosing and at scheduled kill;
- a table of mean/median (pooled approach) and individual (individual approach) DPM values, as well as the range of values for both approaches, and stimulation indices for each dose (including vehicle control) group;
- statistical analysis, where appropriate;
- time course of onset and signs of toxicity, including dermal irritation at site of administration, if any, for each animal.

Discussion of results:

- A brief commentary on the results, the dose-response analysis, and statistical analyses, where appropriate, with a conclusion as to whether the test substance should be considered a skin sensitiser.

## LITERATURE

(1) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. Food and Chemical Toxicology 30, 165-169.

(2) Kimber, I. Dearman, R.J. Scholes E.W, and Basketter, D.A (1994). The local lymph node assay: developments and applications. Toxicology, 93, 13-31.

(3) Kimber, I. Hilton, J. Dearman, R.J. Gerberick, G.F. Ryan, C.A. Basketter, D.A. Lea, L. House, R.V. Ladies, G.S. Loveless, S.E. Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. Journal of Toxicology and Environmental Health, 53 563-79 (1998).

(4) OECD (1992). Guideline 406 Skin Sensitisation.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. Food and Chemical Toxicology, 34, 999-1002.

(6) 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 sensitisation tests. Food and Chemical Toxicology, 34, 985-997.

(7) Basketter, D.A. Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food and Chemical Toxicology. (in press) 36 327-33.

(8) Van Och, F.M.M, Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicology 146 49-59.

(9) Dearman, R.J. Hilton, J. Evans, P. Harvey, P. Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. Journal of Applied Toxicology 18 281-4.

(10) National Institute of Environmental Health Sciences (1999). The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494, Research Triangle Park, N.C. (http://iccvam.niehs.nih.gov).

(11) OECD (2002). Guideline 404 Acute Dermal Irritation/Corrosion.

(12) Basketter, D.A. Selbie, E. Scholes, E.W. Lees, D. Kimber, I. and Botham, P.A. (1993). Results with OECD recommended positive control sensitisers in the maximisation. Buehler and local lymph node assays. Food and Chemical Toxicology, 31, 63-67.

(13) Basketter DA, Lea LJ, Dickens A, Briggs D, Pate I, Dearman RJ, Kimber I (1999). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. J. Appl. Toxicology, 19, 261-266.

(14) Basketter DA, Blaikie L, Derman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, Evans P, White IR, and Rycroft RTG (2000). Use of local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. Contact Dermatitis, 42, 344-48.

# 添付資料 7

## 試験法公定化までの道程と JaCVAM の担当

試験法公定化までの道程と JaCVAM の担当