

# LLNA-BrdU 法バリデーション研究 (第2実験)

## 報告書

報告書作成日：2008 年6月9日

改訂日：2008年7月24日

改訂日：2008年8月6日

改定日：2009年1月17日

報告書作成責任者： 小島 肇

LLNA-BrdU 法バリデーション研究実行委員会

委員長

小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所薬理部）

委員

大森 崇（京都大学大学院医学研究科医療統計学分野）

寒水孝司（大阪大学臨床医工学融合研究教育センター）

吉村 功（東京理科大学工学部経営工学科）

出原賢治（ダイセル化学工業株式会社 評価・解析センター）

五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部）

金澤由基子（財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 医療用具試験室）

武吉正博（財団法人 化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所研究第一部）

青儀 巧（大塚製薬株式会社 徳島研究所 安全性研究センター 第2研究室）

田中正志（明治製菓株式会社 医薬開発部門 動態安全性研究所）

有馬和範（大正製薬株式会社 安全性研究所）

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

牧 栄二（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）

略号の原語または意味

ACD: Allergic contact dermatitis

A00: Acetone/Olive oil

BrdU: Bromodeoxyuridine

BT: Buehler test

EC3: The estimated concentration that yields a stimulation index of three

FCA: Freund's complete adjuvant

GLP: Good laboratory practice

GPMT: Guinea pig maximization test

HCA: Hexyl cinnamic aldehyde

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods

LLNA: Local lymph node assay

OECD: Organization for Economic Cooperation and Development

PBS: Phosphate buffered saline

RI: Radioactive isotope

SI: Stimulation index

SOP: Standard operating procedure

目次	
はじめに	5
要約	5
1. 背景および目的	6
1.1 皮膚感受性	6
1.2 モルモットを用いた試験法	6
1.3 LLNA 法	6
1.4 LLNA-BrdU 法	6
1.5 本研究にいたるまでの過程	6
1.6 本研究の目的	7
2. 方法	8
2.1 組織と役割	8
2.1.1 研究の組織	
2.1.2 各組織の役割	
2.2 LLNA-BrdU の操作法	8
2.3 操作法の普及と改良	9
2.3.1 技術研修会	
2.3.2 予備試験	
2.3.3 第1次バリ実験によって生じたプロトコールの問題点	
2.4 被験物質および溶媒	10
2.4.1 割付	
2.4.2 試料等の配布	
2.5 実験実施のスケジュール	12
2.6 データの管理	12
2.7 データ解析の方法	13
2.7.1 体重, リンパ節重量, ATP 発光量	
2.7.2 SI 値とその95%信頼区間の算出	
2.7.3 SI値に基づく判定	
2.7.4 施設内再現性, 施設間再現性の評価	
2.7.5 代替可能性の検討	
3. 結果	14
3.1 選択された被験物質と割付け結果	14
3.2 研究の質について	14
3.3 データの取り扱いについて	14
3.3.1 析出, 沈殿等について	
3.3.2 採用基準の遵守と解析データセット	
3.3.3 解析の方針	
3.4 背景基礎データ	17
3.4.1 体重	
3.4.2 リンパ節重量	

3.4.3 BrdU取り込み量（吸光度）	
3.5 LLNA-BrdU の分析感度.....	24
3.6 各被験物質の用量反応関係.....	24
3.7 施設内再現性 .....	26
3.8 施設間再現性 .....	26
3.9 代替可能性.....	27
4. 考察.....	28
4.1 本研究の位置付け.....	28
4.2 本研究の妥当性.....	28
4.2.1 本研究で評価したLLNA-BrdU 法の特徴	
4.2.2 被験物質の選択	
4.2.3 試験法の普及	
4.2.4 データの質に関して	
4.2.5 本研究の判定基準の変更について	
4.3 個々の被験物質に対する考察.....	31
4.4 評価委員会からの提言とその対応.....	31
5. 結論.....	32
謝辞.....	32
参考文献.....	32

## はじめに

本報告書は、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会により組織されたLLNA-BrdU法バリデーション研究実行委員会(以後、LLNA-BrdUバリ実行委と記す)が実施したバリデーション研究報告書である。

## 要約

【目的】Local lymph node assay (LLNA 法) はマウスのリンパ節細胞増殖反応により皮膚感作性を評価する試験法であり、モルモットを用いた試験法 (Guinea-pig maximization test および Buehler test) の代替法として広く知られている。LLNA法は感作誘導期のリンパ節細胞増殖反応を<sup>3</sup>Hで標識されたチミジン (<sup>3</sup>H-thymidine) のDNAへの取り込みを指標として皮膚感作性を評価する。しかしながら、我が国ではRI (Radioactive isotope) の取り扱い規制が厳しく、LLNA法の普及は十分ではない。LLNA-BrdU法は、<sup>3</sup>H-thymidine の取り込み量の代わりにbromodeoxyuridine (BrdU) の取り込み量を指標として判定する方法であり、RIの管理に厳しい本邦でも容易に実施できるという利点がある。我々は過去に、施設間再現性と代替可能性の検討を主目的とし、9施設で12被験物質を用いてLLNA-BrdU法のキャッチアップバリデーション研究を実施した。その結果、実施したLLNA法と比較して陽性対照物質のバラツキが大きく、試験法の改良が必要であると結論された。そこで、Standard operating procedure (SOP)を改訂し、7施設で10被験物質を用いて第2次バリデーション実験を行った。

【方法】本研究はLLNA-BrdU法の改訂SOPに基づいて実施した。陽性対照物質(50% hexyl cinnamic aldehyde : HCA)以外の10の被験物質のうち、3物質は全7施設で、残りの7物質は3施設毎に評価した。各被験物質をコード化し、3用量を秤量し各実験施設に送付した。各実験施設において、溶媒にて用事調製した被験物質を用いて実験がなされた。溶媒対照群のBrdUと取り込み量に対する被験物質群のBrdU取り込み量の比 (Stimulation index, SI値) が2を超えた場合、陽性と判定した。

【結果と考察】改訂SOPで規定していた実験の成立条件は厳しすぎたため、その遵守は難しかった。このため、より広くLLNA-BrdU法が使用できるようにするために成立条件を緩和した解析結果に基づき検討を行った。その結果、全施設で評価した陽性対照物質HCAのSI値のバラツキは小さく、施設内再現性も高かった。この結果により、緩和した実験成立条件下でSOPの改良を確認できたといえる。実験に用いたすべての被験物質の結果を解析した結果、濃度依存性および施設間再現性も高く、LLNA法との結果とほとんど一致した。

【結論】本研究で得られた結果から、LLNA-BrdU法は施設間再現性がよく、LLNA法と同程度に代替可能性が高い試験法であるといえる。

## 1. 背景および目的

### 1.1 皮膚感作性

アレルギー性接触皮膚炎 (ACD: Allergic contact dermatitis) は、外部からの化学物質等 (抗原) が繰り返し接触し皮膚から吸収され、感作されたTリンパ球による接触部位に一致して炎症反応をきたした現象をいう。ACDは医薬品、産業で使用される化学物質や消費者に使用される製品までのさまざまな化学物質との関連性が知られている。このため、化学物質の感作性は安全性評価において重要である。

### 1.2 モルモットを用いた試験法

動物を用いた皮膚感作性試験法としては、モルモットを用いた試験であるGuinea-pig maximization test (GPMT法) およびBuehler test (BT法) が長い間利用されてきた (OECD, 1992)。これらの試験法では、化学物質により感作を誘導し、一定期間後、惹起処置による皮膚反応の観察により感作性を評価する。評価方法は、肉眼判定によるため主観が入る可能性があると言われている。

GPMT法では、感度を高めるために通常 Freund's complete adjuvant (FCA) を被験物質と乳化して皮内投与により感作を誘導するが、BT法ではFCAを用いず、被験物質の皮膚への繰り返し塗布により感作を誘導する。

### 1.3 LLNA 法

近年、マウスを用いた感作評価方法としてLLNA法 (Local lymph node assay) が開発され、現在までに多くの研究成果が広く報告されている (Basketter and Scholes, 1992, Basketter ら, 2002, Haneke ら, 2001)。

また、この方法は Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) の安全性試験ガイドライン429としても承認されているだけでなく (OECD, 2002)、Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) の Immunotoxicology Working Group によるプロトコールとしても推奨されている (ICCVAM, 2001)。

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

しかし、LLNA法は感作誘導期のリンパ節細胞増殖反応を<sup>3</sup>Hで標識されたチミジン (<sup>3</sup>H-thymidine) のDNAへの取り込みを指標として皮膚感作性を評価する。我が国ではRI (Radioactive isotope) の取り扱い規制が厳しく、LLNA法の普及は十分ではない。

### 1.4 LLNA-BrdU法

財団法人 化学物質評価機構 (以後、化評研) は、<sup>3</sup>H-thymidineの代わりにBrdU (Bromodeoxyuridine) の取り込み量によりリンパ細胞増殖を検出する指標としたLLNA-BrdU法を開発した (Takeyoshi ら, 2001)。

### 1.5 本研究にいたるまでの過程

化評研は、LLNA-BrdU法の動物実験代替法としての確立を目的とし、厚生労働科学研究班 (主任研究者 大野泰雄) に評価を依頼した。研究班ではこの方法がRIを用いないという利点以外にも簡便で、かつ時間のかからず、評価するに値する方法であると判断し、日本動物実験代替法学会評価委員会に評価を依頼した。その結果、LLNA-BrdU法には複数の施設で実施されたバリデーション研究が必要とされ、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会がLLNA-BrdU法バリデーション研究実行委員会 (以下、LLNA-BrdUバリ実行委) を組織させ、この実行委員会がバリデーション研究を実施した。その結果は、実験終了後の2007年2月9日の第3回LLNA-BrdUバリ実行委で示された。実施した12の被験物質の濃度範囲で得られた陽性対照物質の結果はLLNA

法と比較してバラツキが大きく、試験法の改良が必要であると結論された。以後、この実験をLLNA-BrdU第1次バリデーション実験（以後、第1次バリ実験）と定義し、Standard operating procedure（SOP）を改良して実施する実験をLLNA-BrdU第2次バリデーション実験（以後、第2次バリ実験）と定義する。本報告書はこの第2次バリ実験をまとめたものである。

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

#### 1.6 本研究の目的

本研究の研究計画には、以下の目的を含む皮膚感作性試験代替法（LLNA-BrdU法）第2次バリデーション研究計画書（LLNA-BrdU法第2次バリ研究計画：資料1）に従い実施された。

本研究の目的は、LLNA-BrdU法第2次バリ実験を被験物質の盲検下で実施したときにおける、以下の3点の多施設での実験による評価である。

- 1) 複数の施設間でどの程度一致するか（施設間再現性）
- 2) LLNA-BrdU第1次バリデーション実験の改善が妥当か
- 3) 過去にLLNA法で得られた判定結果とどの程度一致するか（代替可能性）

なお、3)の目的に対しては、LLNA-BrdU法とGPMT/BT法との代替可能性の一致性についての検討も含めた。

## 2. 方法

### 2.1 組織と役割

#### 2.1.1 研究の組織

本研究を遂行するための研究組織，LLNA-BrdU法第2次バリデーション研究実行委員会(以下，LLNA-BrdU 第2次バリ実行委)は次の委員で構成された。

##### 1) 実験施設代表者

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

##### 2) バリデーション委員会委員

日本動物実験代替法学会バリデーション委員会に属する数名。

##### 3) 各実験実施施設の代表者として必要な委員

各実験実施施設から数名。

第1次バリ実験に参加した9施設のうち，化学物質評価研究機構，明治製薬株式会社は都合で第2次バリデーション研究の実験を辞退した。したがって，7施設の代表者がLLNA-BrdU 第2次バリ実行委として本研究に参加した。ただし，提案施設である化評研の代表者は，第2次バリ実行委の技術担当者として研究に参加した。

LLNA-BrdUバリ実行委を資料2「LLNA-BrdU第2次バリ実行委」に，実験参加施設およびその実験担当者を資料3「LLNA-BrdU 第2次バリ実行委担当者一覧」に示す。

#### 2.1.2 各組織の役割

LLNA-BrdU第2次バリ実行委の中にいくつかの担当を設けた。担当およびその役割は以下のとおりである。  
実行委員長：研究組織と運営・進行を計画通りに行い，最終報告を作成する。

技術研修担当者：LLNA-BrdU法の内容，SOP，記録用紙等の説明を行い，問い合わせに対応する。

被験物質選定担当者：資料4「バリ被験物質候補リスト」より，研究に用いる物質を選定する。

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

動物手配担当者：実験用動物の注文・搬入を手配する。

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

実験参加施設代表者：本実行委に所属し，実験参加施設を代表する。

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

実験責任者：施設で実施された実験について責任を持つ。

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

#### 2.2 LLNA-BrdUの操作法

資料1「LLNA-BrdU 法第2次バリ研究計画」にもとづいて，この研究用にLLNA-BrdUバリ実行委がSOPを作成した。このSOPの最終版は資料5「LLNA-BrdU 法実験SOP Ver.1.02」に示すが，本研究での実験手順の概略を以下に示す。

使用動物：雌性のCBA/JNCrIj マウス（8週齢にて入荷）

投与群設定：被験物質に合わせた溶媒を用いる溶媒対照，陽性対照(50% hexyl cinnamic aldehyde / A00溶

液), および3用量の被験物質群あたり動物数: 1群あたり4匹

溶媒: 盲検下で送付.

被験物質: 被験物質をコード化し, 3用量を秤量し各実験施設に送付, 各施設で用事調製

測定指標: BrdU測定キットを用い, 吸光度でBrdU取り込み量を測定

試験操作: 図1に概略を示す.

両耳介に被験物質を3日間続けて塗布する.

最終感作の約48時間後に, BrdU生理食塩水溶液(5mg/mL) 0.5mLを腹腔内投与する.

BrdU投与の約24時間後に, リンパ節を採取する.

予め, 各試験施設において実施された予備実験の結果に基づき, 陰性対照ウェルの吸光度が0.1~0.2となる細胞浮遊液の容量を決定する.

リンパ節をつぶし, プラスチック容器に 決められた容量の生理食塩液を加えて均一な細胞浮遊液を作製し, 1個体あたり3穴に分注する. BrdU測定キットを用い, マイクロプレートリーダーによる吸光度を測定する. この値が0.2を超える場合には細胞浮遊液の冷蔵保存液を翌日以降希釈して, 再測定に用いる.

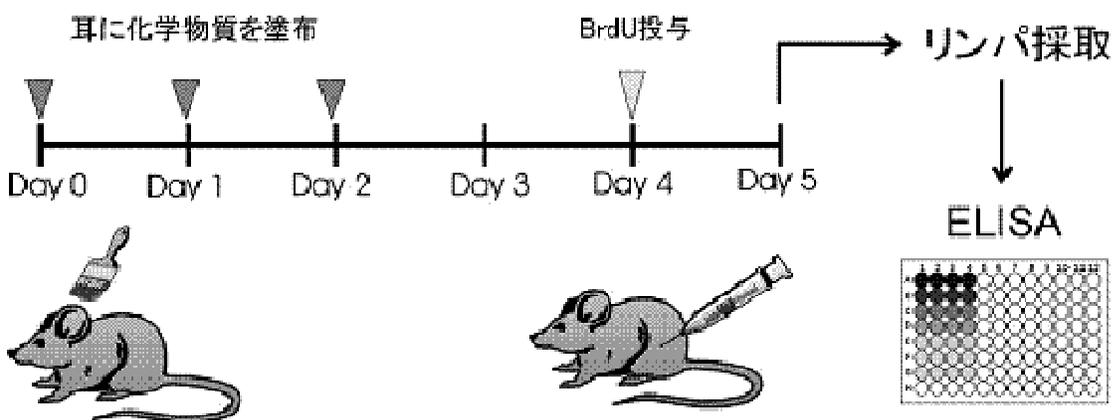


図1 . LLNA-BrdU操作法

1 回に実施する被験物質数: 1 回の操作で2被験物質および陽性対照物質を実施する.

結果の評価: 試験群毎に平均吸光度を求め, 陰性対照群の吸光度に対する比(Stimulation Index, SI)を算出した後, 各用量群の平均 SI 値を算出する. 被験物質投与群の SI 値の平均値が2を超える場合を陽性と判定する.

## 2.3 操作法の普及と改良

### 2.3.1 技術研修会

各実験施設の実験担当者がLLNA-BrdU法の原理と操作法を理解できるように第1次バリ実験の前に技術研修会を実施した. 実験実施施設は第1次バリ実験と同じであるため, 第2次バリ実験のための技術研修は行わなかった.

### 2.3.2 予備実験

第1次バリ実験では, 作成されたSOP で十分な実験が行えるかどうかを確認するために, 予備実験の実施を実施した. 第2次バリ実験では各施設が実験経験を有するために予備実験は実施しなかった.

### 2.3.3 第1次バリ実験によって生じたSOPの問題点および追加実験による改訂

第1次バリ実験のSOPでは溶媒群での平均吸光度が0.2を超える場合には細胞浮遊液を希釈して再測定すると決めていたが、ブランク値を差し引くことおよび下限は決めていなかった。このため希釈しすぎた場合には、細胞がなくなり吸光度が0に近い値を取る施設が現れた。SI値は、被験物質群と溶媒群のBrdU量取り込み量の比で定義されるので、溶媒群の吸光度が0に近くなると、極端に大きな値をとった。これが第1次バリ実験で、陽性対照物質と被験物質において施設間差の大きかった一因であると考えられた。

原因追求のため、一部の施設で追加実験が行われ、2007年6月28日の第4回LLNA-BrdUバリ実行委および2007年8月23日の第5回LLNA-BrdUバリ実行委にて、それらの経験を受けて議論した。結果として、特に以下の点についての対応を決定した。

生理食塩液の容量は実施施設で事前に至適条件を検討の後、陰性対照ウェルの吸光度が0.1~0.2となる条件を採用する。この範囲内を実験の成立条件とする。

A00群または溶媒群の平均吸光度が0.2を超えた場合には細胞浮遊液を更に希釈し、再測定する。0.1を下回った場合には解析対象から外す。なお、予め数段階の希釈浮遊液(5~15mLの浮遊液を調製し、生理食塩液で希釈した浮遊液)を調製し、同時に測定しても構わないが、その際には実験成立条件を満たす1データのみを採用する。

吸光度測定の際に3ウェルに生理食塩水を加え、Blankとする。このBlankを測定値から差し引く。

また、以下に示す合意を得た。

リンパ節の潰し方により吸光度値が異なったため、丁寧に細胞浮遊液を調製する、

実験者から上がってきた試験操作法の問題点(BrdU腹腔内投与、洗浄・乾燥操作など)もSOPに追記する

## 2.4 被験物質および溶媒

本研究は盲検下での実施が決められていたので、実験者の安全性を確保するために、被験物質の候補リストを公開し、その中から被験物質を選択した。被験物質の候補リストは被験物質選定担当者により作成され、研究の開始前にすべての研究者に伝えられた。被験物質の候補は、既知データが豊富で、LLNA法の実験結果が存在するものを採用した。被験物質の候補リストを資料4「バリ被験物質の候補リスト」に示す。

実験施設に属さない被験物質選定担当者が、皮膚感作性の程度およびバランスを考慮して最終的に10被験物質を選択した。選択にあたっては、すでに公開されている第1次実験の被験物質から一部を変更し、ECVAM performance standard (Basketter, 2008) から得られた情報をもとにした。選択された被験物質は、LLNAの結果を参考に3濃度を設定した。これらの被験物質は各濃度に秤量された後に遮蔽化され、調製する溶媒とともに各実験施設に送付された。ただし、2,4-dinitrochlorobenzeneについては、低濃度での適用もあり正確な秤量ができないと予想された。そこで、2,4-dinitrochlorobenzeneの10%A00溶液を原液として用いて秤量した。送付された被験物質およびコード記号一覧を表1として示す。

溶媒としてアセトン(和光純薬工業株式会社、東京、純度99.5%、Lot.DPR1014)、オリーブ油(和光純薬工業株式会社、Lot.WKL1049)、ジメチルスルフォキシド(DMSO:和光純薬工業株式会社、純度99%、Lot.LTQ5318)を用いた。オリーブ油はこのバリデーション研究開始時に開封した。

### 2.4.1 割付

使用する動物数を少なくするため、1回の実験で、溶媒が同じ2つの被験物質群(1施設の1実験のみ3被験物質群)と共通の1つの溶媒の群を構成した。1回の試験で2種の被験物質について実施し、それらの溶媒は共通となるように割付した。

被験物質割付担当者は、表2に概念的に示すように、被験物質選定担当者が選択した被験候補物質のうち3

物質を標準被験物質とし全実験施設に、その他の被験物質については、物質の感作性の程度と用いる溶媒のバランスを考慮して3施設に割り付けた。

#### 2.4.2 試料等の配布

試料等手配担当者は、各被験物質の試料溶液を計量し、実験参加施設に配布した。動物手配担当者は、各実験施設と打ち合わせを行い、動物搬入を手配した。配布された被験物質のリストを表1に示す。

表1. LLNA-BrdU法バリデーション研究の被験物質リスト

Code	No.	Substance name	Solvent	Classifi -cation	Dose ( % )			Manufacture	Purity(%)	Lot.
B	1	Isopropanol (2-Propanol)	AOO	Negative	10	25	50	Wako Pure Chemical Industries,Ltd	99.9	ASF8123
H	2	Hexylcinnamic aldehyde (Hexylcinnamal, -Hexylcinnamaldehyde)	AOO	Moderate	10	25	50	Wako Pure Chemical Industries,Ltd	97	LAQ5834
E	3	2,4-Dinitrochlorobenzene (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene)	AOO	Extreme	0.1	0.3	1	Wako Pure Chemical Industries,Ltd	99	EWH5685
G	4	Methyl salicylate	AOO	Negative	10	25	50	Wako Pure Chemical Industries,Ltd	98	EWH6518
A	5	Nickel sulfate (Nickel( ) sulfate hexahydrate)	DMSO	False Negative	1	3	10	Wako Pure Chemical Industries,Ltd	99-102	SDN0275
D	6	trans-Cinnamic aldehyde	AOO	Moderate	1	3	10	Kanto Chemical Industries, Ltd		709W2149
C	7	Eugenol	AOO	Weak	10	25	50	Wako Pure Chemical Industries,Ltd	95	TSK3738
F	8	Glutaraldehyde solution (ab.25%)	ACE	Extreme	0.1	0.3	1	Wako Pure Chemical Industries,Ltd	25	EWG0243
J	9	Formaldehyde solution (36~ 38%)	ACE	Strong	1	3	10	Wako Pure Chemical Industries,Ltd	36-38	EWF7698
I	10	L-Lactic acid	DMSO	Negative	10	25	50	Wako Pure Chemical Industries,Ltd	85-92	PKJ7904

\*文献参照：Haneke ら (2001) およびGerberick ら (2004)

表2. 被験物質の割付方針の概念図

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

## 2.5 実験実施のスケジュール

平成19年9月～12月にかけて各施設が実験スケジュールを立て、実験した（資料6）。

## 2.6 データの管理

### 2.6.1 記録用紙

記録用紙各実験施設は実験の記録・結果をSOPにもとづき作成された所定の記録用紙（資料7「LLNA-BrdUバリデーション研究記録用紙」）に記録した。

実験担当者は、以下の記録・結果を所定の記録用紙に記録する。

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

### 2.6.2 データシート

データ解析担当者は、データ解析のために、個々の動物より得られる測定結果（体重，リンパ節重量，BrdU量）を入力するデータシート（資料8「データシート」）を作成した。各実験施設には被験物質のコードが記載されたデータシートのファイルが送付され、実験担当者は実験の測定結果を入力した。データ解析はここに入力されたデータに基づいて実施されている。

### 2.6.3 データクリーニング

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

#### 2.6.4 データベース

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

#### 2.7 データ解析の方法

##### 2.7.1 体重，リンパ節重量，BrdU取り込み量

体重（1日目と6日目），リンパ節重量，BrdU取り込み量は基本統計量（平均，標準偏差など）を算出した。BrdU取り込み量は1個体あたり3穴の測定値が得られるが，それらの平均値を求め解析に用いた。

##### 2.7.2 SI 値とその95%信頼区間の算出

主なデータ解析は，被験物質群または陽性対照群の溶媒対照群に対する吸光度の比（SI値）に基づき実施した。SI値は，個々の実験の用量毎にひとつの値が得られる。SI値の近似的な95%信頼区間は，資料9「SI値とその95%信頼区間の計算法」に示す方法により得た。

##### 2.7.3 SI値に基づく判定

採用された実験において，濃度依存的に正の傾きでSI値が2を超えた場合を陽性，そうでない場合を陰性と判定した。

##### 2.7.4 施設内再現性，施設間再現性の評価

施設内再現性，施設間再現性は，SI値の値の大きさとそれに基づく陽性と陰性の判定により評価した。

##### 2.7.5 代替可能性の検討

代替可能性の指標として，GPMT 法もしくはBT 法による判定（Guinea-pig maximization testおよびBuehler test，以下，GPMT/BT 法），LLNA 法のそれぞれの方法に対する感度，特異度，一致割合，陽性予測度，陰性予測度を算出した。本研究はバリデーション研究であるため，同一物質の同一濃度での実験を複数の施設で実施している。このため，同一物質の判定は，個々の濃度について算出されたSI値の重み付平均が濃度依存的に正の傾きでSI値が2を超えた場合を陽性，そうでない場合を陰性とする判定に基づいた。

以上の解析には，SAS version 9を用いた。

### 3. 結果

#### 3.1 選択された被験物質と割付け結果

表3に各施設への被験物質の割付結果を示す．基本的には1施設あたり6被験物質を実施した．すべての被験物質が3施設以上の施設で実験するようにした．

表3． 割り付けられた被験物質とその実験順序

施設番号	第1期		第2期		第3期	
	4～6群	7～9群	4～6群	7～9群	4～6群	7～9群
1	4 (G)	3 (E)	2 (H)	1 (B)	8 (F)	9 (J)
2	2 (H)	1 (B)	3 (E)	6 (D)	7 (C)	4 (G)
3	4 (G)	3 (E)	2 (H)	1 (B)	10 (I)	5 (A)
4	3 (E)	6 (D)	1 (B)	2 (H)	10 (I)	5 (A)
5	9 (J)	8 (F)	3 (E)	6 (D)	1 (B)	2 (H)
6	2 (H)	1 (B)	8 (F)	9 (J)	7 (C)	3 (E)
7	2 (H)	1 (B)	7 (C)	3 (E)	10 (I)	5 (A)

#### 3.2 研究の質について

研究の質を確保するために、以下を実施した．

- ・ 記録用紙のチェック

すべての記録用紙を確認し、不備については後日問い合わせて確認した．

- ・ データクリーニング

実験担当者は、実験中に測定した吸光度などを、データシートをプリントアウトしたものに書き込み、後に電子ファイルのデータシートに入力した．データ解析担当者は、測定値を記入したプリントアウトを集め、入力された電子ファイルのデータシート値との整合性を確認した．値が異なった場合、各施設へ問い合わせて、最終的な値を決めた．

- ・ 技術移転および予備試験の実施

- ・ 計画書、SOP の改訂経過の記録

#### 3.3 データの取り扱いについて

##### 3.3.1 析出、沈殿等について

被験物質調製時に析出や沈殿のないように超音波処理やポルテックスミキサーを用いて調製し、溶液でない場合の均一塗布を記録用紙で確認した．

##### 3.3.2 採用基準の遵守と解析データセット

前述したように第2次バリ実験では、

- ・ プレート毎に陰性対照ウェルの吸光度 0.1～0.2 の範囲を実験の成立条件とする．

- ・ A00 群または溶媒群の平均吸光度が 0.2 を超えた場合には細胞浮遊液を更に希釈後、再測定する．

と決められていた．陽性対照物質群および被験物質群についてこの基準の採否を示したものをデータ採否(1)として表4(左)、表5(左)にそれぞれ示すとともに、表6に内訳をまとめた．これらの表からわかるように、この基準を満足するのは、陽性対照群では21実験中14実験(66.7%)、被験物質群では42実験中24実

験 (57.1%) のみとなった。2008年2月15日の第6回 LLNA-BrdU 第2次バリ実行委では、この結果を踏まえて、再度採用基準について検討した。そこでは以下に示す意見が得られた。

- ・ 予備試験で条件を決めても、本試験でその条件に適合しない場合もあり、溶媒の吸光度0.1~0.2は厳しすぎる。
- ・ この基準を絶えず満たすことは実技的に難しい、本来はリンパ節重量毎に液量を決めるべきである。
- ・ 吸光度が範囲外になった場合、希釈しても細胞浮遊液の倍率通りにならず、必ずしも理論的な値が得られない。希釈により誤差が大きくなるのではないだろうか。本方法は、希釈によって再測定が可能である利点を持つとされているが、これがバラツキを大きくし、結果として施設間差を大きくしているようである。

これを踏まえ LLNA-BrdU 第2次バリ実行委員会では、吸光度の範囲を緩和し、1回目の測定結果を採用し、希釈後の再測定データは用いないことにした。また、陽性対照物質 HCA 50%濃度における SI 値が2以上でない場合には、被験物質の SI 値は正確に求められないと判断することにし、後の解析に採用しないことを決定した。以後の解析はこの新たな基準よっている。この基準を採用した場合の陽性対照群、被験物質群での採否を示したものを、データ採否(2)として表4(右)および表5(右)に示した。また、表6にはまとめた実験数を示した。この基準を満足するのは、陽性対照群では21実験中20実験(95.2%)、被験物質群では42実験中40実験(95.2%)となった。

なお、希釈・再実験の実施状況は添付資料とした。

表4. 陽性対照物質のデータ採否

コード	データ採否(1) 施設番号							データ採否(2) 施設番号						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
第1期	×	×	○	×	○	○	△	○	×	○	○	○	○	○
第2期	○	○	○	△	○	○	△	○	○	○	○	○	○	○
第3期	○	○	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

データ採否(1): 吸光度0.1~0.2, 希釈・再実験データの使用

データ採否(2): 吸光度の制限なし, 希釈・再実験データの使用なし

○: 採用, ○: 非実施による不採用, ×: 適合外による不採用

表5. 被験物質のデータ採否

被験物質 コード	感作性*	データ採否(1)							データ採否(2)						
		施設番号							施設番号						
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
A	-			×	△			○			○	○			○
B	-	○	×	○	△	△	△	○	○	×	○	○	○	○	○
C	+		○				○	○		○				○	○
D	+		○		×	○				○		○	○		
E	+	×	○	○	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	+	○				△	○		○				○	○	
G	-	×	○	○					○	○	○				
H	+	○	×	○	△	△	△	○	○	×	○	○	○	○	○
I	-			×	△			○			○	○			○
J	+	○				△	○		○				○	○	

\* LLNA 法の評価結果に基づく感作性の判定

データ採否(1): 吸光度 0.1~0.2, 希釈・再実験データの使用

データ採否(2): 吸光度の制限なし, 希釈・再実験データの使用なし

○: 採用, ◯: 非実施による不採用, ×: 適合外による不採用

表6. データ採否の内訳

	データ採否(1)			データ採否(2)		
	採用	不採用	合計	採用	不採用	合計
陽性対照	14 (66.7)	7	21	20 (95.2)	1	21
被験物質	24 (57.1)	18	42	40 (95.2)	2	42
合計	38 (60.3)	25	63	60(95.2)	3	63

○, × は不採用として計数

### 3.3.3 解析の方針

データ採否(2)の基準を満たすデータを対象とした解析を「主解析」、データ採否(1)の基準を満たすデータを対象とした解析を「副次解析」とする。以後、主解析を用いた結果を表や図に示す。ただし、背景基礎データの基本等計量について、これらの区別はない。

主解析および副次解析の解析対象データの一覧を表7に示す。標柱の「×」はデータ採否の基準を満たすデータが存在しないことを表す。なお、副次解析の結果は付録として添付した(資料10)。

表7．解析対象データ

施設	時期	主解析	副次解析 (陽性対照)	副次解析 (被験物質)
1	第1期	1回目	×	×
	第2期	1回目	再測定	1回目
	第3期	1回目	再測定	1回目
2	第1期	×	×	×
	第2期	1回目	1回目	1回目
	第3期	1回目	1回目	1回目
3	第1期	1回目	再測定	再測定
	第2期	1回目	再測定	再々測定
	第3期	1回目	×	×
4	第1期	1回目	×	×
	第2期	1回目	×	×
	第3期	1回目	1回目	×
5	第1期	1回目	1回目	×
	第2期	1回目	1回目	1回目
	第3期	1回目	1回目	×
6	第1期	1回目	1回目	×
	第2期	1回目	1回目	1回目
	第3期	1回目	再測定	再測定
7	第1期	1回目	×	1回目
	第2期	1回目	×	1回目
	第3期	1回目	1回目	1回目

### 3.4 背景基礎データ

#### 3.4.1 体重

実験開始1日目、6日目の動物の体重の基本統計量をそれぞれ表7および表8に示す。施設によっては1日目に比べ6日目の体重が増えていない施設もあったが、全体として施設間の大きな変動はみられなかった。

なお、施設6で検疫・馴化期間中に5匹が事故死したため、次の4条件でそれぞれ欠測が生じた。

- 被験物質H 高濃度
- 被験物質B 低濃度
- 被験物質B 中濃度
- 被験物質B 高濃度

表 8. 1日目および6日目の体重の基本統計量

17JUL2008:17:36:16

Summary statistics of the body weight (g) at day 1 (wstat\_w1.txt)

Labo. ID	n	Mean	SD	Min	25%	Median	75%	Max
1	108	22.2	1.38	18.4	21.40	22.00	23.2	25.8
2	108	22.6	1.32	20.1	21.70	22.70	23.5	25.9
3	108	22.1	1.38	19.3	21.00	22.00	23.0	26.2
4	108	21.8	1.44	17.6	21.00	21.70	22.7	25.9
5	108	22.6	1.25	19.6	21.75	22.70	23.4	25.2
6	104	22.0	1.30	19.7	21.00	21.80	22.9	25.3
7	108	22.1	1.55	18.9	21.00	21.85	23.1	27.8

17JUL2008:17:36:16

Summary statistics of the body weight (g) at day 6 (wstat\_w6.txt)

Labo. ID	n	Mean	SD	Min	25%	Median	75%	Max
1	108	22.6	1.48	18.7	21.50	22.40	23.45	26.4
2	108	23.8	1.52	20.6	22.55	23.80	24.55	28.0
3	108	23.1	1.48	20.0	22.10	23.00	24.15	27.0
4	108	22.4	1.57	18.1	21.30	22.35	23.60	26.1
5	108	22.8	1.36	19.7	21.70	22.80	23.85	26.0
6	104	22.0	1.27	19.0	21.00	22.05	22.95	24.8
7	108	22.9	1.42	19.7	21.75	22.80	24.00	26.3

#### 3.4.2 リンパ節重量

リンパ節重量の基本統計量を表9に示す。被験物質の影響が強いほどリンパ節重量は増加した。

表9. リンパ節重量の基本統計量

17JUL2008:17:36:16

Summary statistics of the lymph node weight (mg) (lymwstat.txt)

Chemical	n	Mean	SD	Min	Median	Max
Vehicle (for PC)	84	3.5	0.67	1.4	3.60	5.8
Positive control	84	7.5	1.28	5.1	7.70	10.6
Vehicle (for test chemical)	84	3.8	0.91	2.2	3.70	6.9
A (Low)	12	5.0	1.11	3.5	4.80	7.3
A (Mid)	12	5.4	1.07	3.9	5.30	7.5
A (High)	12	5.7	1.10	4.4	5.45	7.6
B (Low)	27	3.5	0.79	1.8	3.50	5.5
B (Mid)	27	3.3	0.68	2.0	3.10	4.7
B (High)	27	3.3	0.62	2.4	3.10	5.0
C (Low)	12	4.7	1.15	3.1	4.40	6.6
C (Mid)	12	7.3	1.86	3.7	7.20	10.5
C (High)	12	8.6	0.90	7.2	8.80	10.0
D (Low)	12	3.7	0.57	2.7	3.65	4.6
D (Mid)	12	5.3	0.52	4.5	5.25	6.0
D (High)	12	7.3	1.10	5.9	7.10	9.5
E (Low)	28	8.3	1.70	5.8	8.05	12.9
E (Mid)	28	15.4	2.38	9.7	15.70	20.0
E (High)	28	21.5	2.67	16.8	22.15	25.9
F (Low)	12	3.7	0.63	2.8	3.50	4.7
F (Mid)	12	5.5	1.04	3.3	5.70	7.2
F (High)	12	6.6	1.49	3.5	6.90	8.5
G (Low)	12	3.8	0.36	3.3	3.75	4.5
G (Mid)	12	3.9	0.65	2.8	3.80	5.1
G (High)	12	4.2	0.56	3.3	4.20	5.1
H (Low)	28	4.7	1.03	3.0	4.35	6.9
H (Mid)	28	6.5	1.06	4.7	6.35	8.5
H (High)	27	7.7	1.53	4.9	7.70	10.7
I (Low)	12	4.2	0.61	3.2	4.15	5.1
I (Mid)	12	5.4	1.08	3.4	5.45	6.8
I (High)	12	5.2	1.19	3.6	4.90	8.0
J (Low)	12	4.5	1.17	2.1	4.60	6.4
J (Mid)	12	4.8	1.40	2.7	4.60	7.0
J (High)	12	5.5	1.09	3.7	5.75	7.1

### 3.4.3 BrdU取り込み量 (吸光度)

陽性対照物質, その溶媒のBrdU取り込み量 (吸光度) およびSI値を図3および表10に示す. 溶媒の測定値の平均値が0に近くなると, SI値が極端に大きくなる現象が生じる. 表10に示すように, 各実験で溶媒群内の個々の測定値が0.05より低い場合もあったが, 表11に示すように, 最小値が0.05以上であり, 最大値は0.32までに入っていた.

各被験物質, その溶媒のBrdU取り込み量 (吸光度) およびSI値を表12にすべて示した.

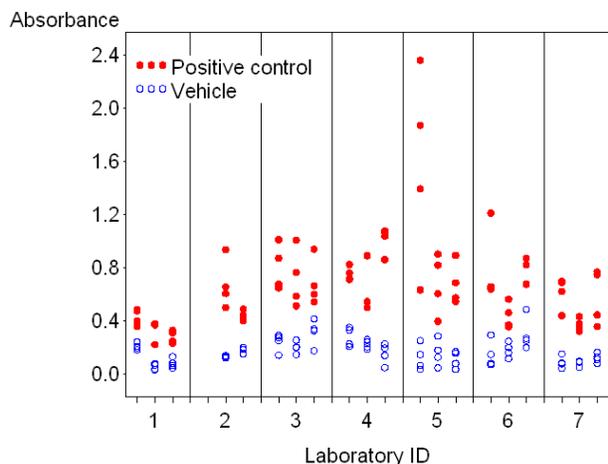


図3. 各施設のBrdU取り込み量（吸光度の分布）

表10. 溶媒対照の施設・時期毎の吸光度の群内平均，SI値とその95%信頼区間

17JUL2008:17:36:17

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

Labo. ID	Term	Vehicle mean absorbance	PC mean absorbance	SI	95%CI lower	95%CI upper
1	1	0.209	0.432	2.07	1.72	2.48
	2	0.055	0.337	6.11	3.79	9.85
	3	0.082	0.282	3.43	2.15	5.48
2	2	0.131	0.677	5.15	3.91	6.79
	3	0.174	0.438	2.52	2.14	2.97
3	1	0.241	0.804	3.34	2.37	4.70
	2	0.203	0.720	3.54	2.45	5.11
	3	0.316	0.689	2.18	1.46	3.25
4	1	0.281	0.756	2.69	2.07	3.51
	2	0.224	0.710	3.17	2.28	4.41
	3	0.154	1.012	6.58	3.96	10.91
5	1	0.126	1.569	12.46	5.14	30.17
	2	0.161	0.683	4.24	2.12	8.46
	3	0.112	0.678	6.07	3.34	11.05
6	1	0.150	0.793	5.30	2.48	11.30
	2	0.183	0.440	2.41	1.67	3.47
	3	0.304	0.765	2.52	1.64	3.87
7	1	0.089	0.614	6.86	4.02	11.72
	2	0.085	0.372	4.39	3.31	5.82
	3	0.122	0.581	4.78	3.05	7.50

表11. 溶媒吸光度の群内平均の基本統計量

n	平均	標準偏差	最小値	中央値	最大値
20	0.1701	0.0750	0.055	0.158	0.316

表12. 各被験物質の施設・時期毎の吸光度の群内平均，SI値とその95%信頼区間

25JUL2008:16:32:31								
Mean absorbance and SI value (SI_sub_A.txt)								
Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	SI	95%CI lower	95%CI upper
A	3	Low	4	0.221	0.303	1.37	0.80	2.38
	3	Mid	4	0.221	0.424	1.92	1.24	2.96
	3	High	4	0.221	0.570	2.58	1.81	3.68
	4	Low	4	0.210	0.431	2.05	1.24	3.38
	4	Mid	4	0.210	0.420	2.00	1.19	3.36
	4	High	4	0.210	0.952	4.53	2.56	8.00
	7	Low	4	0.145	0.273	1.88	1.31	2.71
	7	Mid	4	0.145	0.386	2.66	1.67	4.24
	7	High	4	0.145	0.385	2.66	1.65	4.28

25JUL2008:16:32:31								
Mean absorbance and SI value (SI_sub_B.txt)								
Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	SI	95%CI lower	95%CI upper
B	1	Low	4	0.158	0.350	2.22	1.02	4.80
	1	Mid	4	0.158	0.120	0.76	0.45	1.28
	1	High	4	0.158	0.145	0.92	0.53	1.60
	3	Low	4	0.266	0.261	0.98	0.61	1.57
	3	Mid	4	0.266	0.227	0.85	0.57	1.28
	3	High	4	0.266	0.199	0.75	0.47	1.19
	4	Low	4	0.241	0.240	1.00	0.47	2.09
	4	Mid	4	0.241	0.292	1.21	0.54	2.71
	4	High	4	0.241	0.380	1.58	0.84	2.94
	5	Low	4	0.055	0.052	0.94	0.50	1.78
	5	Mid	4	0.055	0.038	0.69	0.39	1.21
	5	High	4	0.055	0.040	0.71	0.43	1.18
	6	Low	3	0.253	0.516	2.04	0.87	4.77
	6	Mid	3	0.253	0.283	1.12	0.66	1.91
	6	High	3	0.253	0.383	1.51	0.83	2.76
	7	Low	4	0.120	0.058	0.48	0.23	0.99
	7	Mid	4	0.120	0.115	0.95	0.65	1.40
	7	High	4	0.120	0.121	1.01	0.40	2.55

25JUL2008:16:32:31								
Mean absorbance and SI value (SI_sub_C.txt)								
Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	SI	95%CI lower	95%CI upper
C	2	Low	4	0.173	0.226	1.31	0.93	1.85
	2	Mid	4	0.173	0.422	2.45	1.71	3.50
	2	High	4	0.173	0.546	3.17	2.30	4.36
	6	Low	4	0.210	0.306	1.46	1.08	1.97
	6	Mid	4	0.210	0.573	2.73	1.56	4.77
	6	High	4	0.210	0.667	3.18	2.23	4.52
	7	Low	4	0.123	0.359	2.92	2.24	3.82
	7	Mid	4	0.123	0.514	4.18	2.82	6.20
	7	High	4	0.123	0.870	7.08	5.64	8.88

25JUL2008:16:32:31

## Mean absorbance and SI value (SI\_sub\_D.txt)

Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	SI	95%CI lower	95%CI upper
D	2	Low	4	0.178	0.196	1.10	0.78	1.55
	2	Mid	4	0.178	0.397	2.23	1.59	3.13
	2	High	4	0.178	0.600	3.37	2.42	4.68
	4	Low	4	0.271	0.426	1.57	1.01	2.44
	4	Mid	4	0.271	0.796	2.94	2.32	3.71
	4	High	4	0.271	0.947	3.49	2.67	4.57
	5	Low	4	0.150	0.171	1.14	0.65	2.01
	5	Mid	4	0.150	0.315	2.10	1.52	2.89
	5	High	4	0.150	0.617	4.11	3.02	5.58

25JUL2008:16:32:31

## Mean absorbance and SI value (SI\_sub\_E.txt)

Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	SI	95%CI lower	95%CI upper
E	1	Low	4	0.302	0.674	2.23	1.67	2.97
	1	Mid	4	0.302	1.110	3.67	2.93	4.61
	1	High	4	0.302	1.298	4.30	3.58	5.16
	2	Low	4	0.178	1.137	6.39	4.64	8.79
	2	Mid	4	0.178	1.162	6.52	4.65	9.16
	2	High	4	0.178	1.490	8.36	6.11	11.46
	3	Low	4	0.220	0.941	4.27	3.16	5.77
	3	Mid	4	0.220	1.378	6.25	4.92	7.95
	3	High	4	0.220	1.319	5.99	4.76	7.53
	4	Low	4	0.271	1.005	3.71	2.93	4.69
	4	Mid	4	0.271	1.434	5.29	4.24	6.60
	4	High	4	0.271	1.490	5.50	4.40	6.86
	5	Low	4	0.150	2.243	14.94	11.24	19.86
	5	Mid	4	0.150	2.819	18.78	14.41	24.48
	5	High	4	0.150	2.540	16.93	12.80	22.39
	6	Low	4	0.210	0.711	3.38	2.56	4.47
	6	Mid	4	0.210	0.944	4.50	3.34	6.05
	6	High	4	0.210	1.014	4.83	3.63	6.42
7	Low	4	0.123	0.705	5.73	4.14	7.95	
7	Mid	4	0.123	1.509	12.28	8.87	17.00	
7	High	4	0.123	1.593	12.96	10.28	16.35	

25JUL2008:16:32:31

## Mean absorbance and SI value (SI\_sub\_F.txt)

Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	SI	95%CI lower	95%CI upper
F	1	Low	4	0.107	0.188	1.76	1.10	2.82
	1	Mid	4	0.107	0.257	2.40	1.55	3.71
	1	High	4	0.107	0.400	3.73	2.33	5.98
	5	Low	4	0.053	0.395	7.44	2.44	22.66
	5	Mid	4	0.053	0.689	12.98	4.99	33.72
	5	High	4	0.053	1.525	28.73	12.82	64.36
	6	Low	4	0.163	0.162	0.99	0.71	1.39
	6	Mid	4	0.163	0.308	1.89	1.30	2.75
	6	High	4	0.163	0.367	2.25	1.62	3.13

25JUL2008:16:32:31

## Mean absorbance and SI value (SI\_sub\_G.txt)

Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	SI	95%CI	
							lower	upper
G	1	Low	4	0.302	0.431	1.43	1.16	1.75
	1	Mid	4	0.302	0.417	1.38	0.96	1.98
	1	High	4	0.302	0.381	1.26	1.03	1.54
	2	Low	4	0.173	0.192	1.11	0.80	1.55
	2	Mid	4	0.173	0.201	1.16	0.83	1.62
	2	High	4	0.173	0.248	1.44	1.02	2.04
	3	Low	4	0.220	0.242	1.10	0.73	1.67
	3	Mid	4	0.220	0.267	1.21	0.75	1.96
	3	High	4	0.220	0.309	1.40	0.89	2.21

25JUL2008:16:32:31

## Mean absorbance and SI value (SI\_sub\_H.txt)

Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	SI	95%CI	
							lower	upper
H	1	Low	4	0.158	0.248	1.57	0.97	2.55
	1	Mid	4	0.158	0.412	2.61	1.62	4.22
	1	High	4	0.158	0.537	3.41	2.10	5.52
	3	Low	4	0.266	0.320	1.20	0.74	1.96
	3	Mid	4	0.266	0.548	2.06	1.31	3.23
	3	High	4	0.266	0.764	2.87	1.91	4.32
	4	Low	4	0.241	0.491	2.04	1.23	3.36
	4	Mid	4	0.241	0.625	2.59	1.67	4.01
	4	High	4	0.241	0.804	3.34	2.08	5.36
	5	Low	4	0.055	0.291	5.25	2.45	11.26
	5	Mid	4	0.055	0.474	8.57	3.83	19.16
	5	High	4	0.055	0.746	13.48	7.27	24.97
	6	Low	4	0.253	0.450	1.78	1.01	3.13
	6	Mid	4	0.253	0.727	2.87	1.76	4.69
	6	High	3	0.253	0.827	3.27	1.54	6.94
	7	Low	4	0.120	0.192	1.59	1.13	2.25
	7	Mid	4	0.120	0.366	3.04	2.10	4.41
	7	High	4	0.120	0.462	3.84	2.06	7.16

25JUL2008:16:32:31

## Mean absorbance and SI value (SI\_sub\_I.txt)

Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	SI	95%CI	
							lower	upper
I	3	Low	4	0.221	0.241	1.09	0.71	1.67
	3	Mid	4	0.221	0.365	1.66	1.09	2.52
	3	High	4	0.221	0.397	1.80	1.08	3.00
	4	Low	4	0.210	0.359	1.71	1.00	2.93
	4	Mid	4	0.210	0.397	1.89	1.18	3.02
	4	High	4	0.210	0.343	1.63	1.00	2.67
	7	Low	4	0.145	0.175	1.21	0.86	1.69
	7	Mid	4	0.145	0.313	2.16	1.46	3.20
	7	High	4	0.145	0.367	2.53	1.57	4.09

## Mean absorbance and SI value (SI\_sub\_J.txt)

Chemical	Labo. ID	Concentration	n	Mean absorbance for vehicle	Mean absorbance for chemical	SI	95%CI lower	95%CI upper
J	1	Low	4	0.107	0.330	3.08	1.84	5.15
	1	Mid	4	0.107	0.471	4.40	2.92	6.62
	1	High	4	0.107	0.191	1.78	1.22	2.61
	5	Low	4	0.053	0.225	4.25	1.48	12.22
	5	Mid	4	0.053	0.088	1.67	0.75	3.72
	5	High	4	0.053	0.883	16.64	5.67	48.78
	6	Low	4	0.163	0.261	1.60	1.09	2.34
	6	Mid	4	0.163	0.293	1.80	1.30	2.49
	6	High	4	0.163	0.321	1.97	1.37	2.84

## 3.5 LLNA-BrdUの分析感度

本報告書では、分析感度を陽性対照物質が適切に陽性と判定される能力と定義した。図4に示す各実験の陽性対照物質のSI値とその95%信頼区間を示す。

施設2の第1期でSI値が2未満となった。このため、この施設2の第1期の被験物質群（物質Bおよび物質H）のデータは不採用とし、以後の解析に含めていない。

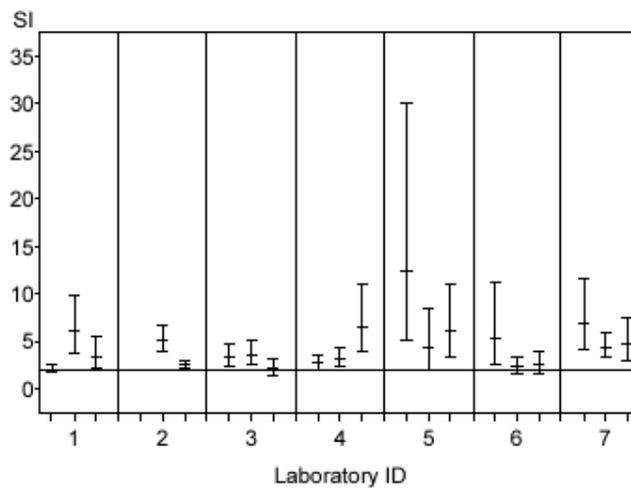
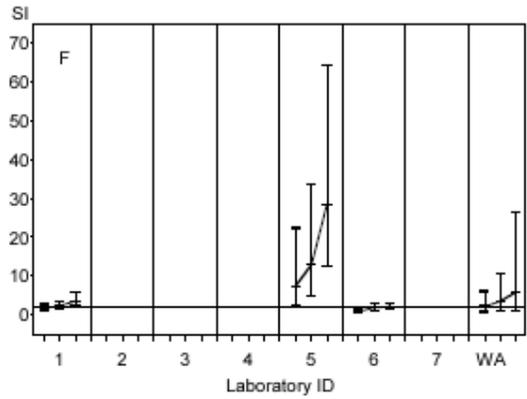
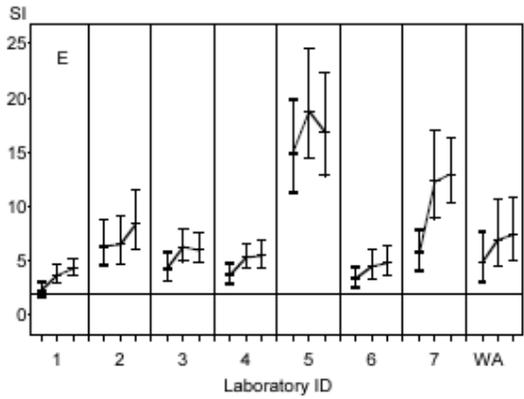
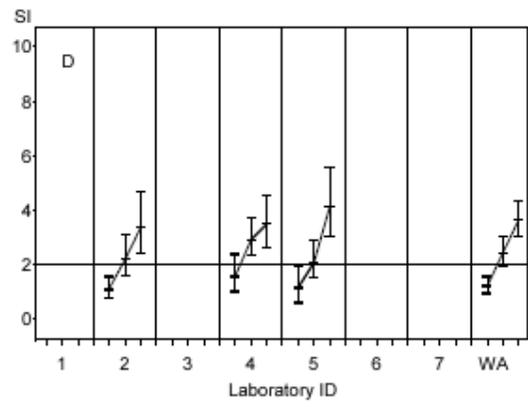
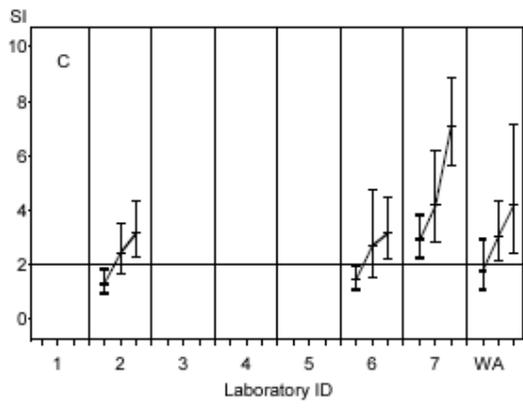
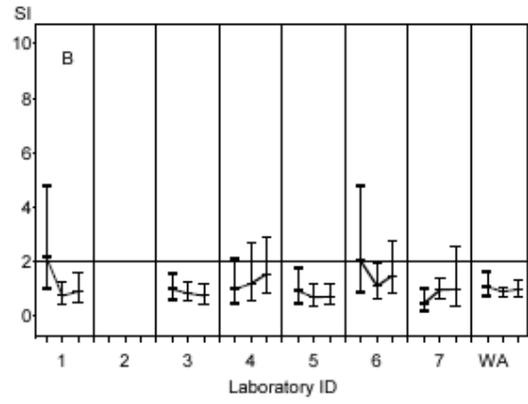
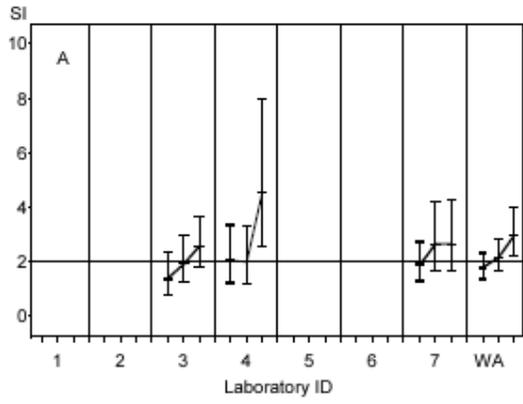


図4. 第2次バリ実験のSI値

## 3.6 各被験物質の用量反応関係

図5にSI値の用量反応関係を示す。図中WAと示されているのは、変量効果モデルを用いたメタ・アナリシスにより得られたSI値の重み付き平均を示している。



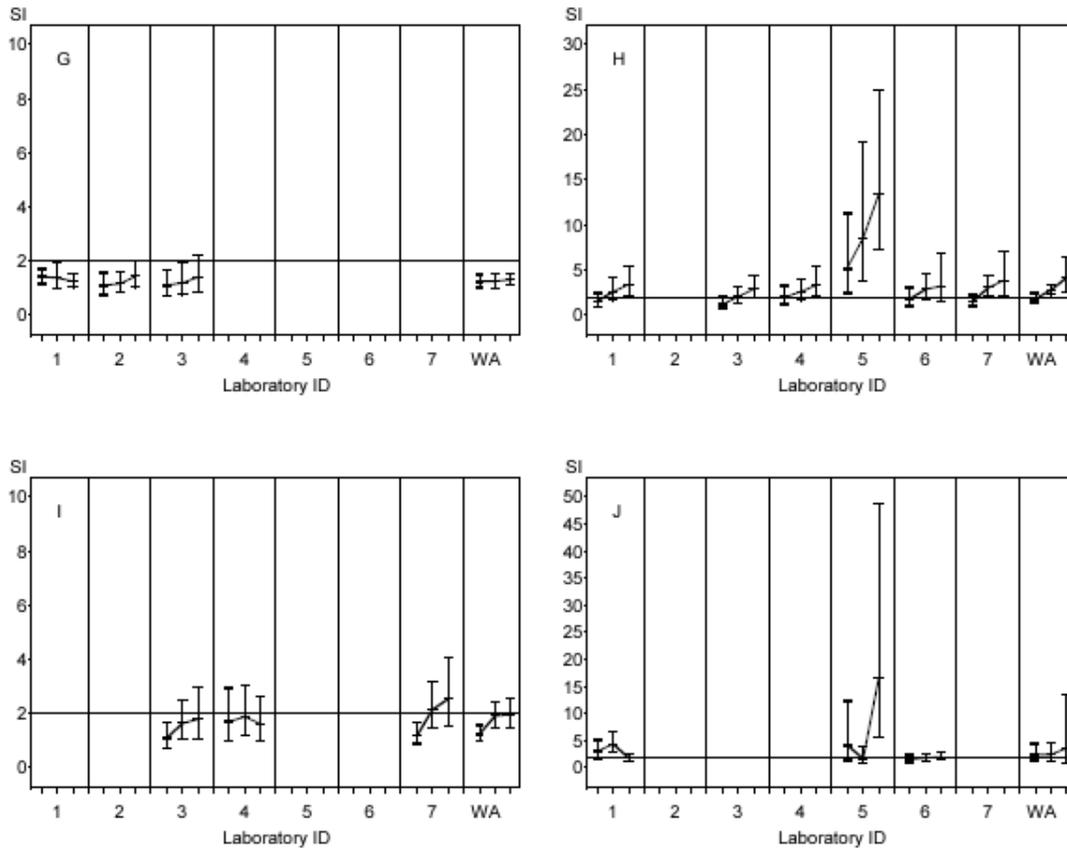


図5.物質毎に各施設のSI値

### 3.7 施設内再現性

図4から陽性対照物質に関する各施設内の再現性を把握できる。図中に示された信頼区間を考慮すると、SI値のばらつきはそれほど大きくはないため、施設内再現性は良好であると判断した。また、この陽性対照物質はHCAの50%濃度であり、これは物質Hの最高濃度と同じものである（図5）。図4と図5（Hの最高濃度）に示されるSI値からも施設内の再現性は高いといえる。

### 3.8 施設間再現性

表13にSI値が濃度依存的に正の傾きでSI値が2を超えるものを陽性、そうでないものを陰性と判定した場合の結果を示した。施設間で判定の結果が食い違うのは物質I：lactic acidと物質J：formaldehydeであるが、図5からは施設間差は大きくないと考える。図5からは、LLNAで陰性と判定されている物質B：isopropanol、物質G：methyl salicylate、物質I：lactic acidの施設間再現性は極めて高い。物質E：2,4-dinitrochlorobenzene、物質F：glutaraldehyde、物質H：hexylcinnamic aldehyde、物質J：formaldehydeの施設5のSI値が他の施設に比べて、高い値を取っていた。施設5と7は陽性対照物質でも他の施設に比べ、高いSI値を報告している。これらの結果と信頼区間の幅を考慮すると、施設間差は受け入れられると考える。

I：lactic acidにおいて施設7が、J：formaldehydeにおいて施設6が他の施設と異なった判定結果を示した。I：lactic acidは図5に示されるように、SI値の施設感差は大きくない。J：formaldehydeの施設7は、高濃度でのSI値は大きい用量依存性が明確ではない。溶媒対照の吸光度が低く、被験物質の吸光度が高めの値を示したことが高濃度で高いSI値を示した原因のようである。

表13. 陽性・陰性の判定結果

Code	Substance name	LLNA classification	Lab No.						
			1	2	3	4	5	6	7
A	Nickel sulfate	False Negative			P	P			P
B	Isopropanol	Negative	N		N	N	N	N	N
C	Eugenol	Weak		P				P	P
D	Cinnamic aldehyde	Moderate		P		P	P		
E	2,4-Dinitrochlorobenzene	Extreme	P	P	P	P	P	P	P
F	Glutaraldehyde	Extreme	P				P	P	
G	Methyl salicylate	Negative	N	N	N				
H	Hexylcinnamic aldehyde	Moderate	P		P	P	P	P	P
I	Lactic acid	Negative			N	N			P
J	Formaldehyde	Strong	P				P	N	

P:陽性, N:陰性

### 3.9 代替可能性

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

図5に示される重み付平均に基づき, 代替可能性を検討した結果を表14, 表15に示す。LLNA-BrdU法とGPMT/BT法の比較では, 食い違いはなく(表14), LLNA-BrdU法とLLNA法の比較ではLLNA法では偽陰性を示すと報告されているA: nickel sulfateが食い違う結果となった(表15)。判定の食い違った物質A: nickel sulfateは, LLNA-BrdU法では3施設すべてで陽性と判定されており, いずれの施設の結果も用量反応関係は明確であった。表16には以上の結果を指標の一覧としてまとめた。いずれの指標でも代替可能性は高かった。

表14. LLNA-BrdU法とGPMT/BA法の比較表

		LLNA-BrdU法		合計
		+	-	
GPMT/BT法	+	7	0	7
	-	0	3	3
合計		7	3	10

表15. LLNA-BrdU法とLLNA法

		LLNA-BrdU法		合計
		+	-	
LLNA法	+	6	0	6
	-	1	3	3
合計		7	3	10

表16. 代替可能性の指標

	n	感度	特異度	一致度	陽性予測度	陰性予測度
LLNA-BrdU 法 vs GPMT/BT 法	10	100%	100%	100%	100%	100%
		(7/7)	(3/3)	(10/10)	(7/7)	(3/3)
LLNA-BrdU 法 vs LLNA 法	10	85.70%	100%	90%	100%	100%
		(6/7)	(3/3)	(9/10)	(6/6)	(3/3)

#### 4. 考察

##### 4.1 本研究の位置付け

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

LLNA-BrdU法はLLNA法におけるエンドポイントの改良法であり、両試験法の原理は同じである。そして、本研究に用いた被験物質は、LLNA法の性能を評価するために実施された被験物質を用いた。したがって、本バリデーション研究は、上記のキャッチアップバリデーション研究に該当すると考えた。

##### 4.2 本研究の妥当性

###### 4.2.1 本研究で評価したLLNA-BrdU法の特徴

本研究で評価した試験法であるLLNA-BrdU法はの原理はLLNA法と同じである。LLNA-BrdU法の特徴は、エンドポイントをBrdUの取り込み量としてキットを用いて吸光度の測定としている。吸光度の測定操作は極めて簡便であり、測定結果は迅速に得られる。

また、LLNA-BrdU法の実験そのものはLLNA法に近く、被験物質の投与に関する変更は行われていない。

###### 4.2.2 被験物質の選択

本研究では、既知のデータが豊富でLLNA法での実験結果がわかっている20の被験物質のリスト(資料4)の中から10被験物質を選択した。LLNA法による文献のEC3値に基づき感作性を3段階[無(negative),弱(weak, moderate),強(strong, extreme)]に分類した場合、10被験物質の感作性の内訳は、無が3物質、弱が3物質、強が4物質であり、試験物質の選択は妥当と考えた。第1次バリ実験では、ブラインドされた被験物質を配布者が事前に調製して送付したが、第2次バリ実験では秤量したものを送付した。変更の理由として、被験物質の安定性確保、第1次バリ実験で被験物質の析出が認められた物質について各実験施設で改めて調製できなかったという短所を解決するためである。用事調製に変更したことより、実験者による状態確認と溶液もしくは均一な懸濁液の調製が可能になった。ただし、以前から長所と言われていた以下の要件も満たされた。各被験物質の同一濃度での結果を比較する、適用濃度から感作性の強度を予測できないようにする、溶媒の選択。また、LLNA-DA法バリデーション研究において溶媒でプラスチック容器が溶けたとの反省をもとに、すべての被験物質溶液はガラス瓶に入れたものが配布された。

#### 4.2.3 試験法の普及

施設間差を少なくするために、本研究ではデータシートを作成してデータの入力フォーマットを統一した。第1次バリ実験の経験を経て、第2次バリ実験の結果を採用したので十分な経験を持つ施設での実験になったと考えられる。

#### 4.2.4 データの質に関して

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

実験についての記録用紙(資料7)を作成した。記録用紙には実験担当者・実験責任者のもとで、機器の校正・作動確認、使用液・試薬の使用について、動物への適用、実験時間が記録され、各施設に残されている。これらの記録は試料等手配担当者およびデータ解析担当者ですべて確認作業が行われ、不備については聞き取り調査を実施し、すべての内容を確認した。

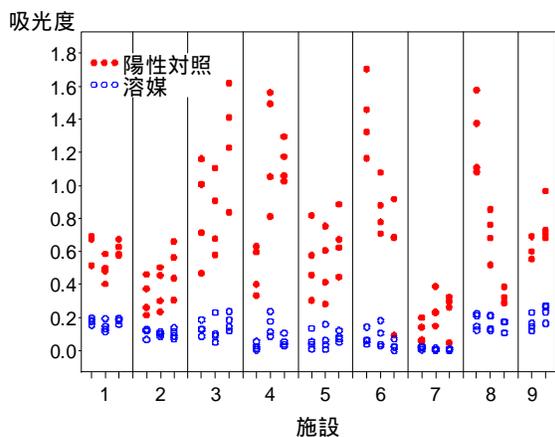
測定値がこの研究のために準備された一定の書式のデータシート(資料8)に正しく記録されているかどうかを確認するために、データクリーニングが行われ、実験中にデータシートのプリントアウトに入力されたデータと入力されたファイルとの値の整合性が確認された。なお、このデータシートは入力規制機能を用いて、不適切な値が入らないように設計された。なお、各施設から集められたデータシートの電子ファイルは、プログラムにより一括して読み込まれ、データベースが作成されている。

#### 4.2.5 本研究の判定基準の変更について

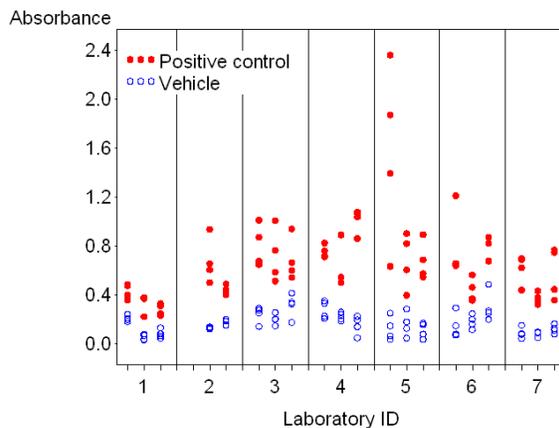
本研究で用いた SOP では、各試験施設において実施された予備実験の結果に基づき、陰性対照ウェルの吸光度が 0.1~0.2 となる細胞浮遊液を調製し実験した。そして、溶媒の BrdU 取り込み量の吸光度の平均値が 0.1~0.2 の範囲に含まれない場合には細胞浮遊液の冷蔵保存液を翌日以降希釈し、再測定するとなっていた。

しかし、希釈をしたとしても溶媒の BrdU 取り込み量の吸光度の平均値を 0.1~0.2 の範囲内に納めることは難しく、実際にこの基準を満たせない実験が多かった。この検討を実施した施設が第1次バリ実験の経験を経た施設であった点を考慮すると、この基準は厳しすぎると考えられる。また、この希釈による再測定が LLNA-BrdU 法の特徴であるが、再測定の結果としてバラツキが大きくなることが懸念された。このため、実行委は、当初設定した基準を採用するのは適切ではないと判断した。そこで、本報告では、希釈前の1回目の吸光度を用い、再測定のデータは用いないという方針に変更した。

この変更が適切かどうかについて、陽性対照物質を用いた結果で第1バリ実験(小島ら,2007)と比較した。図6は陽性対象物質の溶媒および陽性対照物質の BrdU 取り込み量の吸光度を、図7はそこから計算される SI 値とその95%信頼区間を第1次バリ実験と第2次バリ実験で比較したものである(縦軸のスケールが異なるので注意)。図6(a)から、第1次バリ実験では溶媒の吸光度が施設毎で大きく異なっているのがわかる。特に、第1実験の施設7のように溶媒の吸光度の平均値が0に近くなると、相対的に SI 値が大きくなってしまふ(図7(a))。溶媒の BrdU 取り込み量の吸光度の平均値を 0.1~0.2 の範囲に納めることを目指して実施された第2次バリ実験では、結果的に溶媒における BrdU 取り込み量の吸光度の平均値は 0.05~0.32 の間であった。この場合、図7の(b)からわかるように、SI 値が極端に大きくなる傾向はみられない。よって、溶媒における BrdU 取り込み量の吸光度をある程度の範囲に管理することで、安定した結果が得られると考えられる。

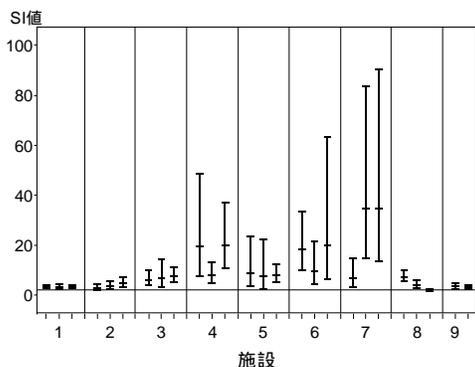


(a) 第1次バリ実験

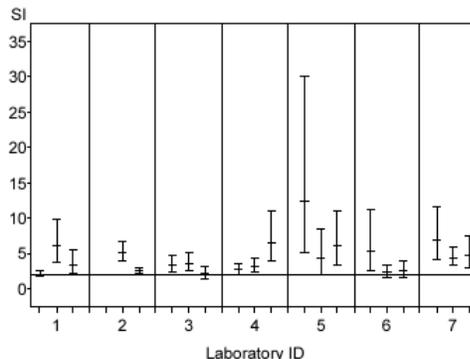


(b) 第2次バリ実験

図6. 第1次バリ実験および第2次バリ実験における陽性対照物質のBrdU取り込み量（吸光度の分布）



(a) 第1次バリ実験



(b) 第2次バリ実験

図7. 第1次バリ実験および第2次バリ実験における陽性対照物質のSI値

SOP では、最終容量 15mL の細胞浮遊液を作成する例が記載されており、複数の施設でこの例に従って実験が行われていた。実験間のばらつきを小さくするために、細胞浮遊液の作成方法は統一した方がよいと考える。この試験法を実施するには、最終容量 15mL 前後で事前に至適条件を検討し、吸光度が 0.1~0.2 に入るようにリンパ節の細胞浮遊液の作製条件を求めることが望ましいと考える。

以上の観点から、現時点における LLNA-BrdU 第 2 バリ実行委の推奨する実験条件は以下のとおりである。

- (1) 事前に溶媒の BrdU 取込み量の平均吸光度を 0.1~0.2 前後にするための至適条件を検討し、細胞浮遊液の最終容量を決める。
- (2) 細胞浮遊液の希釈は行わない。
- (3) 陽性対照物質 HCA50%濃度における SI 値が 2 以上を結果の採用する。

ただし、実験結果を解釈する際、溶媒の平均吸光度があまりに小さい場合には、SI 値が極端に大きくなる場合があることに注意する。

なお、誤解がないように注記しておくが、最終的に推奨する SOP に記載した実験の成立基準に関しては、データ解析上緩和した基準であり、エンドポイントである BrdU の取込み量や陽性の判断基準を変更しているわけではない。エンドポイントと判定基準は研究の計画に規定された事項に基づき解析を実施している。

#### 4.3 個々の被験物質に対する考察

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

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

#### 4.4 評価委員会からの提言とその対応

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

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

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

## 5. 結論

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

## 謝辞

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

本研究は、多くの方の協力を得ました。彼らの協力なしでは本研究を行えませんでした。以下の方々に心より感謝致します。

上森健至（ダイセル化学工業株式会社）、山岸学（ダイセル化学工業株式会社）、三輪麻紀子（国立医薬品食品衛生研究所）、古谷真美（財団法人食品薬品安全センター）、森村智美（財団法人食品薬品安全センター）、志田勝彦（財団法人食品薬品安全センター）、後藤浩彦（大塚製薬株式会社）、織原由佳里（大正製薬株式会社）、山崎紀世（大正製薬株式会社）、小宮千春（富士フイルム株式会社）、吉野幸江（富士フイルム株式会社）、藤島敦（財団法人食品農薬品安全性評価センター）、竹原広（財団法人食品農薬品安全性評価センター）

## 参考文献

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

593–598.

- Basketter, D.A., Casati, S., Gerberick, G. F., Griem P., Philips B. and Worth A. (2005) Skin sensitisation. *Alternatives To Laboratory Animals* 33 supplement 1, 83–103.
- Basketter, D.A., Cockshott, A.C., Corsini, E., Gerberick, G.F., Idehara, K., Kimber, I., Loveren, H.V., Matheson, J., Methling A., Omori T., Rovida, C., Sozu T., Takeyoshi, M. and Casati S. (2008) An evaluation of performance standards and non-radioactive endpoints for the local lymph node assay, *Alternatives To Laboratory Animals*, 36, 243–57.
- Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Hattan, D. G. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 34, 258–273.
- Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kimber, I., Dearman, R. J. and Basketter DA. (2000) Local lymph node assay: Validation assessment for regulatory purposes. *Toxicology* 11, 3–18.
- Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kern, P. S., Dearman, R. J., Kimber, I., Patlewicz, G. Y. and Basketter, DA. (2004) A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis* 50, 274–288.
- Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 34, 274–286.
- Kimber, I., Hilton, J., Botham, P. A., Basketter, DA., Scholes, E. W., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C., Gray, T. J. B. and Waite, S. J. (1991) The murine local lymph node assay: results of an inter-laboratory trial. *Toxicology Letters* 55, 203–213.
- Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Basketter, DA., Scholes, E. W., Ladics, G. S., Loveless, S. E., House, R. V. and Guy A. (1995) An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. *Toxicology* 103, 63–73.
- Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick G. F., Ryan, C. A., Basketter, DA., Lea, L., House, R. V., Ladics, G. S., Loveless, S. E. and Hastings K. L. (1998) Assessment of the skin sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: an interlaboratory evaluation. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 53, 563–579.
- Loveless, S. E., Ladics, G. S., Gerberick G. F., Ryan, C. A., Basketter, DA., Scholes, E. W., House, R. V., Hilton, J., Dearman, R. J. and Kimber, I. (1996) Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial. *Toxicology* 108, 141–152.
- Normand, S. L. T. (1999) Meta-analysis: formulating, evaluating, combining, and reporting. *Statistics in Medicine* 18, 321–359.
- OECD (1992) Organization for Economic Co-operation and Development – OECD guidelines for testing of chemicals. No. 406: Skin sensitization.
- OECD (2002) Organization for Economic Co-operation and Development – OECD guidelines for testing of chemicals. No. 429: Skin sensitization: Local lymph node assay.
- OECD (2005) Organization for Economic Co-operation and Development – OECD series on testing and assessment. No. 34: Guidance document on the validation and international acceptance of new or

updated test methods for hazard assessment.

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

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

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

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

大森 崇ら (2007) LLNA-DA 法バリデーション研究報告書

