

0. まえおき

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

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

1. 研究目的

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

2. 実行組織

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

第2次実行委は次の委員で構成する。

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

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

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

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

実行委員長：研究組織と運営・進行を計画通りに行い、最終報告を作成する。

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

被験物質選定担当者：資料3「被験物質候補リスト」より、研究に用いる物質を選定する。ただし、用いる物質はLLNA-DA法の被験物質と同様にする。

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

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

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

表を保管する。

実験参加施設代表者：第2次実行委に所属し、実験参加施設を代表する。

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

実験責任者：施設で実施された実験について責任を持つ。

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

3. LLNA-BrdU 法の実験手順

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

4. 研究日程

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

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

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

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

5. 実験参加施設

実験参加施設は次の条件を満たすものとする。

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

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

6. 被験物質

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

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

7. 被験物質の実験参加施設への割付

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

表1 被験物質の割付方針の概念図

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

8. 実験動物、機器、被験物質試料の準備

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

動物・機器手配担当者は、各実験施設と打ち合わせを行い、動物の手配を行う。

9. 経費

第2次実行委に参加するための旅費は自弁とする。

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

10. 技術研修と予備実験

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

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

11. データ管理

実験担当者は、以下の記録・結果を所定の記録用紙に記録する。

- (1) 被験物質、溶媒、陽性対照物質溶液

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

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

12. データ解析

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

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

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

13. 中間報告会

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

14. 結果の公表

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

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

15. 各種問い合わせ先

実験内容とSOP：武吉正博「takeyoshi-masahiro@ceri.jp」

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

データシートとその送付：寒水孝司「sozu@ac.jp」

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

以上