

TG442A(LLNA:DA)実施時の耳介厚測定における標準化の検討

○山下邦彦¹、大森崇²、篠田伸介³、萩原沙織³



¹株式会社ダイセル研究統括部コーポレート研究所
²同志社大学
³薬物安全性試験センター



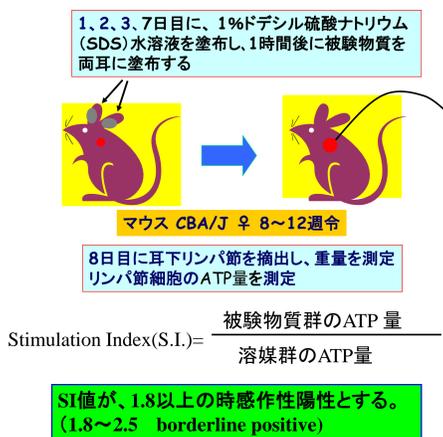
Introduction

株式会社ダイセルが開発した、LLNA:DA法が、2010年7月に、TG442Aとして、OECDテストガイドラインに正式に採択された(図1)。これによると、被験物質の投与濃度の選択基準のひとつとして、耳介厚が25%以上増加しない濃度が示されている。しかしながら、耳介厚の測定のばらつきに関しては具体的な記載はされていない。試験に使用するCBA/Jマウスの耳介の厚みは、部位により0.2mm~0.4mm程度であり、同一の測定者が、同時に連続して測定しても、最大20%程度のばらつきが生じる事がある(表1)。耳介厚の測定のばらつきが大きいと適切な濃度での試験が実施されない可能性がある。即ち、施設間で測定方法、基準が違えば、同じ物質が大きく違う濃度で試験され、適切な評価結果が得られない可能性がある。

また、今回の改訂により、TG442Aにおいて、Borderline positiveの結果(SI 1.8~2.5)が得られた場合にも、耳介厚の測定データが、過剰な刺激が生じていないかの指標の1つとして用いられることから、耳介厚の測定が試験成立及び判定のいずれにおいても重要な要件になってきた。そこで耳介厚測定の標準化のため、個々の測定のばらつきについてどの程度が適切かを、3者共同で、理論的な側面と実際の測定値のデータ解析により検討した。

図1 OECD TG 442A LLNA-DA

表1 耳介厚測定データ



動物No.	測定部位:左(耳の縁)	投与前		最終投与日		剖検日	
		測定値	平均	測定値	平均	測定値	平均
1	1	0.19	0.22	0.24	0.23	0.23	0.21
	2	0.23		0.21		0.20	
	3	0.23		0.19		0.20	
2	1	0.18	0.18	0.21	0.21	0.19	0.19
	2	0.19		0.21		0.19	
	3	0.18		0.21		0.19	
3	1	0.19	0.19	0.20	0.20	0.22	0.21
	2	0.18		0.18		0.21	
	3	0.19		0.23		0.21	
4	1	0.21	0.20	0.22	0.21	0.24	0.22
	2	0.20		0.19		0.21	
	3	0.20		0.21		0.20	

Results

理論的な検討を行うに当たり、過去の実測データを検討した結果、投与前の耳介の周辺部の測定値の平均値は0.18から0.28mm程度であった。この範囲で投与後に25%増加したと仮定したときに得られる標準偏差の値は0.02から0.031であった(表2)。

一方、得られたデータの各個体、各測定者における測定の標準偏差の範囲は、0.006から0.052であり、25%点は0.006、中央値は0.012、75%点は0.021であった。このデータの測定者の間で比べると、熟練者の方が安定した標準偏差であった(図5、図7)。

以上の検討から、耳介の測定は、一連の実験中に同一者により行うことが望ましい。過去のデータと理論的な検討から、耳介周辺部を測定したときの測定のばらつきは標準偏差で0.03以内に収めることが望ましいといえる。

過去のデータから、投与前の耳介の中央部の、測定値の平均値は0.29から0.40mm程度であった。この範囲で投与後に25%増加したと仮定したときに得られる標準偏差の値は0.032から0.044であった(表3)。

一方、得られたデータの各個体、各測定者における測定の標準偏差の範囲は、0.005から0.055であり、25%点は0.006、中央値は0.018、75%点は0.026であった。このデータの測定者の間で比べると、熟練者の方が安定した標準偏差であった(図6、図8)。

以上の検討から、耳介中央部を測定したときの測定のばらつきは標準偏差で0.04以内に収めることが望ましいといえる。

表2

PRE	POST	SE	SD
0.18	0.23	0.016	0.020
0.19	0.24	0.017	0.021
0.20	0.25	0.018	0.022
0.21	0.26	0.019	0.023
0.22	0.28	0.020	0.024
0.23	0.29	0.021	0.025
0.24	0.30	0.022	0.026
0.25	0.31	0.023	0.028
0.26	0.33	0.023	0.029
0.27	0.34	0.024	0.030
0.28	0.35	0.025	0.031

表3

PRE	POST	SE	SD
0.29	0.36	0.026	0.032
0.30	0.38	0.027	0.033
0.31	0.39	0.028	0.034
0.32	0.40	0.029	0.035
0.33	0.41	0.030	0.036
0.34	0.43	0.031	0.038
0.35	0.44	0.032	0.039
0.36	0.45	0.032	0.040
0.37	0.46	0.033	0.041
0.38	0.48	0.034	0.042
0.39	0.49	0.035	0.043
0.40	0.50	0.036	0.044

図5

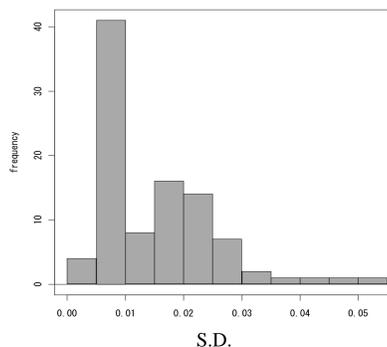


図6

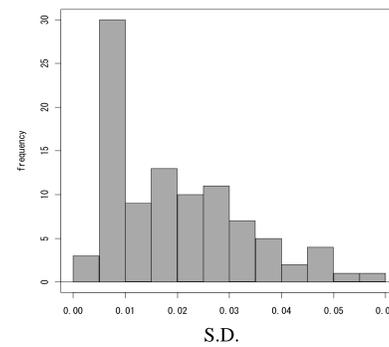


図7

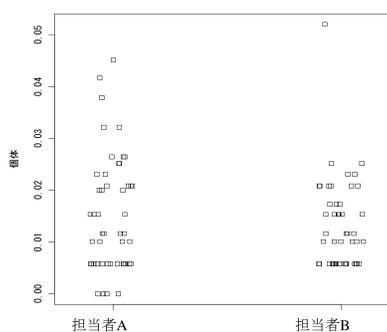
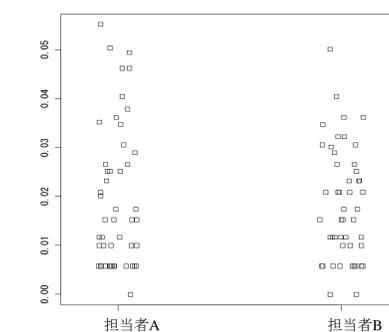


図8



Methods

理論的な検討

CBA/Jマウスの耳介厚を、0.18mm~0.4mmと仮定し、それぞれの投与前の測定値の平均値が投与後に25%増加した場合にt検定で棄却できるような最大の標準偏差を求めることにした。

データによる検討

用いたデータは実際の試験時に2名の測定者が、耳介厚をPEACOCKのDIGITAL THICKNESS GAUGE (G2-257M)(図2)を用いて測定することにより取得したものである。12匹のCBA/Jマウスを使用し、溶媒対照とサンプルの投与を行った。耳介厚の測定は、試験開始日と剖検日に、左右それぞれの耳介について3回行った。

また、測定部位の違いを明らかにする目的で、測定は耳介の端部(図3)と中央部(図4)の2箇所を行い、それぞれのデータを取得した。

図2



図3



図4



Conclusions

OECD TG 442Aを適切に実施するための試験濃度として、過剰な刺激を生じない濃度で実施することが求められている(TG429及びTG442Bも同様)。施設間で同じ試験条件で試験が実施されるための参考として、耳介厚測定の標準化を試みた。その結果、ばらつきの原因としては、測定部位、測定者、測定者の熟練度があることが明らかとなった。25%の増加を統計的に処理することを目的とした理論的な検討の結果、耳介周辺部を測定した場合は、標準偏差0.03以下の測定データを用いること、耳介中央部を測定した場合は、標準偏差0.04以下の測定データを用いることで、客観的な評価が出来ることが示唆された。また、2人の測定者による実際の測定データからも、同様の指標を用いることが妥当であることが示唆された。また、測定においては、一連の試験において、同一の測定者が測定することが望ましく、さらに、熟練者が測定を行うことがより望ましいことが明らかとなった。

(1)OECD Test guideline TG442A(2010)