

ブ会合が4月に開催され、これらのガイドラインが採択された¹⁷⁾。

また、現在審議中の試験ガイドラインには in vitro 皮膚腐食性のための膜バリア試験ガイドライン 435(Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion)、小核試験ガイドライン 487(Micronucleus Test)がある¹⁸⁾。その他の動向に関する情報は無い。

C-3-2 小括

本年度は、in vitro 光毒性試験ガイドライン 432、in vivo 経皮吸収試験ガイドライン 427、in vitro 経皮吸収試験ガイドライン 428、in vitro 皮膚腐食性試験ガイドライン 430(Transcutaneous Electrical Resistance Test)及び in vitro 皮膚腐食性試験ガイドライン 431(Human Skin Model Test)が各国コーディネーター会議により採択されたことから、本邦での実施が要求されることになる。

OECD 毒性試験ガイドラインは、新規化学物質の安全性評価法として幅広く適用されることから、本邦においては、今提案されているガイドライン案や採択された試験法の実施に関して、行政を中心とした産官学による組織的な対応が必要と考えられる。

C-4 日本における代替法開発の動向

C-4-1 厚生労働科学研究班における代替法の評価

本厚生労働科学研究班『安全性評価のための動物実験代替法の開発および評価体制の確立に関する研究』は平成 16 年度に設置された。この研究班の目的の一つは、本邦における代替法評価体制を構築することである。

この評価体制については、平成 13 年度に設置された前厚生労働科学研究班『動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究』において既に検討されてきた。この概要は、広く評価すべき試験法を公募して、提案された試験法があった場合には、評価委員会や評価会議により評価を行う。また施設間バリデーションが必要な場合は、日本動物実験代替学会に施設間バリデーションの実施を委託するという体制となっている。

平成 16 年度の本厚生労働科学研究班における代替法の評価に係わる活動の状況としては、施設間バリデーション及びその解析が終了したのものとしては『酵母及び赤血球を用いる光毒性試験代替法』と『三次元皮膚モデルを用いる皮膚腐食性試験代替法』が挙げられる。これらの結果については、第 33 回日本環境変異原学会第 18 回日本動物実験代替法学会合同学術大会で報告された¹⁹⁾⁻²⁰⁾。また、提案資料について評価委員

会及び評価会議における評価が終了したのものとして『皮膚感作性試験代替法:LLNA-DA 法』があるが²¹⁾、その評価結果については学会等ではまだ公表されていない。

C-4-2 日本動物実験代替法学会における動向
日本動物実験代替法学会には、評価委員会とバリデーション委員会とが常設組織として設置されている。

評価委員会は、本厚生労働研究班から委託された試験法の一次評価を担当し、試験法の種類により個別に編成されている。現在は、『酵母及び赤血球を用いる光毒性試験代替法』及び『皮膚感作性試験代替法:LLNA-DA 法』の評価のワーキンググループが活動している。

一方、バリデーション委員会は、バリデーションに関する実務を担当する委員会で、本厚生労働研究班から依頼された『酵母及び赤血球を用いる光毒性試験代替法』¹⁹⁾及び日本動物実験代替法学会独自のテーマである『市販キットである3次元皮膚モデルを用いる皮膚刺激性試験代替法』²²⁾の施設間バリデーションを実施している。

本邦においては、その他の試験法に関して、行政や学会が関与したバリデーションや評価に関する報告は見あたらない。

C-4-3 小括

本邦における代替法の開発・評価において本年度の特筆すべきことは、本邦独自の代替法の評価機関(仮称:JaCVAM)の構築を目指す本厚生労働科学研究班が新たに設置されたことである。

しかし、現時点では、本邦における代替試験法の社会的認知に向けた活動は、日本動物実験代替法学会の協力を得て本厚生労働科学研究班のみが実施している状況にある。また、バリデーションについては、本厚生労働科学研究班が独自に実施している『三次元皮膚モデルを用いる皮膚腐食性試験代替法』、本厚生労働研究班が日本動物実験代替法学会に委託した『酵母及び赤血球を用いる光毒性試験代替法』及び学会が独自に実施している『市販キットである3次元皮膚モデルを用いる皮膚刺激性試験代替法』のみが挙げられる。この原因は、代替法の開発が、化粧品に関連する産業とそれに係わる行政のみの問題と考えられているところにあるのかも知れない。

今回、本厚生労働研究班に代替法としての評価を希望する試験法として、『皮膚感作性試験代替法:LLNA-DA 法』が提案されてきた。この提案は化粧品に関連する企業からの提案ではないこ

とから、他の産業界における代替法の開発が促進されてきたこと並びに本厚生労働研究班の目指す代替法評価機関(JaCVAM)設置に向けた動きが加速することを期待したい。

D. 考察

各結果小括の項で述べた如く、本年度は、2003年3月11日に公布された「動物実験を実施した原料を配合した化粧品の販売禁止に最終期限を設けたEU化粧品指令第7次改正」の各国の国内法の整備が進められる年として、またEU委員会による動物試験の段階的廃止の timetable 案が公表される年として注目される年であった。

このうち、国内法の整備状況については、化粧品指令第7次改正の期日よりも全般に遅れている模様である。この理由としては、化粧品に係わる法規は各国まちまちであり、整備すべき関連法規が多数存在する国も多いと推定されることが考えられる。

次に、動物試験の段階的廃止の timetable 案についてであるが、ECVAM や SCCNFP の意見を考慮したEU委員会の答申によると、EU域内での動物試験が禁止される2009年3月に代替法が存在すると予測されるのは、皮膚腐食性、急性光毒性、皮膚刺激性(Hazard identification)、眼刺激性、経皮吸収/皮膚透過性及び光遺伝毒性であった。また、その他の試験については、動物試験が禁止される期限までには代替法がないと予測されている。このEU委員会による動物試験の段階的廃止の timetable は、各ステーク合意に基づくものであるが、一部化粧品指令に反した予測であり、そのまま認められるとは限らない。EUにおいては、関係研究者は、化粧品指令第7次改正に定めた目標に向かって、多額のファンドを集め、また研究者を集めて、代替法の開発研究に多大な貢献をして行くものと考えられる。

次にグローバルハーモナイゼーションと代替法の評価体制の構築についてであるが、昨年の前厚生労働科学研究班の分担報告書に、筆者が記述したように、ECVAMやICCVAMに匹敵する本邦独自の、行政認知の代替法評価機関(仮称:JaCVAM)を設置し、ガイドライン化へと結びつけるシステム作りが急務であると考えられる。この評価体制については、前厚生労働科学研究班の活動により大枠が構築できたものと考えられる。また、本邦独自の評価機関設置の動きがあることも一部報じられており²³⁾、提案者の一人として率直に喜ばたい。

これからの課題は、これから設置される代替法評価機関(JaCVAM)により評価されるべき代替法

の継続的な提案と、評価結果をガイドライン化へと結びつけるシステム作りと考える。本邦が代替法開発においてグローバルに貢献するためには、昨年の前厚生労働科学研究班の分担報告書において筆者が記述したように、今後開発が必要な試験法は生体反応の解析を含め非常に難易度が高いと考えられる。これら代替法の開発や評価を総合的に推進するためには、監督官庁の枠を超えた国家レベルでの積極的な研究支援(人的にも、資金的にも)が必要と考える。また、代替法評価機関(JaCVAM)による評価結果を研究報告書のみで終了させず、ガイドライン化へと結びつけるシステム作りが必要であると考えられる。

以上のことを総合的に推進することにより、ECVAM や ICCVAM とのグローバルハーモナイゼーションが構築され、さらには本邦発のグローバルスタンダードが作成されると考えるものである。

E. 結論

本年度は、2003年3月11日に公布された「動物実験を実施した原料を配合した化粧品の販売禁止に最終期限を設けたEU化粧品指令第7次改正」の各国の国内法の整備が進められる年として、またEU委員会による動物試験の段階的廃止の timetable 案が公表される年として注目される年であった。

EU各国における国内法の整備状況であるが、2005年3月初旬においても約7割の国が国内法を整備した状況に留まっている。また、動物試験の段階的廃止の timetable 案についてであるが、ECVAM や SCCNFP の意見を考慮したEU委員会の答申によると、EU域内での動物試験が禁止される2009年3月に代替法が存在すると予測されるのは、皮膚腐食性、急性光毒性、皮膚刺激性(Hazard identification)、眼刺激性、経皮吸収/皮膚透過性及び光遺伝毒性であった。また、その他の試験については、動物試験が禁止される期限までには代替法がないと予測されている。このEU委員会による動物試験の段階的廃止の timetable 案は、一部化粧品指令に反した予測であり、そのまま認められるとは限らない。今後もEU情勢に関しては引き続き正確に調査して行く必要がある。

本年度の米国における代替法開発の動向としては、試験法についての4種眼刺激性試験代替法の評価がICCVAMより実施されたことが挙げられる。現在、ICCVAMとECVAMは、急性毒性試験代替法としての細胞毒性試験の共同バリデーションを実施中であるが、今後、今回評価している眼刺激性試験代替法についてもECVAMとの

相互協力が想定される。

OECDについては、in vitro 光毒性試験ガイドライン 432、in vivo 経皮吸収試験ガイドライン 427、in vitro 経皮吸収試験ガイドライン 428、in vitro 皮膚腐食性試験ガイドライン 430(Transcutaneous Electrical Resistance Test)及び in vitro 皮膚腐食性試験ガイドライン 431 (Human Skin Model Test)が、2004年4月の各国コーディネーター会議により採択されたことから、本邦での実施が要求されることになる。

本邦における代替法の開発・評価において本年度の特筆すべきことは、本邦独自の代替法の評価機関(仮称:JaCVAM)の構築を目指す厚生労働科学研究班が新たに設置されたことである。今後の課題は、これから設置される代替法評価機関(JaCVAM)により評価されるべき代替法の継続的な提案と、評価結果をガイドライン化へと結びつけるシステム作りと考える。今後開発が必要な試験法に関しては、生体反応の解析を含め非常に難易度が高いと考えられる。本邦が代替法開発においてグローバルに貢献するためには、これらの代替法の開発や評価を総合的に推進すべく、監督官庁の枠を超えた国家レベルでの積極的な研究支援(人的にも、資金的にも)が必要と考える。また、代替法評価機関(JaCVAM)による評価結果を研究報告書のみで終了させず、ガイドライン化へと結びつけるシステム作りが必要であると考えられる。

以上のことを総合的に推進することにより、ECVAM や ICCVAM とのグローバルハーモナイゼーションが構築され、さらには本邦発のグローバルスタンダードが作成されると考えるものである。

F.健康危険情報

なし

G. 参考文献

- 1) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council, February 27, 2003; Official Journal of the European Union, L66, 11/03/2003, P0026-0035.
- 2) CTPA News update, February 6, 2003.
- 3) CTPA News update, March 3, 2003.
 - 4) <http://pharmacos.eudra.org/F3/cosmetic/AnimalTest.html>.
- 5) ATLA, 32, 9 (2004).
- 6) ATLA, 32, 67 (2004).
- 7) ATLA, 32, 159 (2004).

8) ATLA, 32, 541 (2004).

9) http://europa.eu.int/comm/health/ph_rsk/committees/sccp/documents/out285_en.pdf.

10) The Rose Sheet Vol. 25 No. 35 p. 5 (2004).

11) <http://pharmacos.eudra.org/F3/home.html>.

12) Commission Directive 2004/94/EC of 15 September 2004.

13) <http://ecb.jrc.it/testing-methods/content1.html>.

14) Federal Register Vol.69, No.201, 19/10/2004, p61504.

15) Federal Register Vol.69, No.104, 28/05/2004, p30693.

16) Federal Register Vol. 69, No. 212, 03/11/2004, p64081.

17) The Rose Sheet Vol.25 No.31, p.10 (2004).

18) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34365_2349687_1_1_1_1,00.html#Draft_guidelines_closed_to_comments.

19) 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集 p84-p86, 2004.

20) 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集 p235, 2004.

21) 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集 p95, 2004.

22) 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会講演要旨集 p96, 2004.

23) FRAGRANCE JOURNAL, 33 (2)、30-35、2005.

H.研究発表

1.論文発表

1) 豊田 英一、“動物実験代替法の国際動向とハーモナイゼーション”、FRAGRANCE JOURNAL, 33 (2)、15-21、2005.

2) 豊田 英一、“化粧品リスクアセスメントに関するグローバル動向と課題”、日本化粧品科学会誌、28 (4)、288-291、2004.

2.学会発表(講演及び学会発表)

1) 足利 太可雄、坂口 齊、米山 桂子、茵 さき子、宮澤 正明、吉田 雪子、伊藤 勇一、鈴木 尋之、板垣 宏、豊田英一、“Relationship

between CD86/CD54 expression and cell viability in in vitro skin sensitization test of water-soluble chemicals using THP-1 cells”、Society of Toxicology 44th annual meeting、2005.

- 2) 坂口 斉、足利 太可雄、宮澤 正明、吉田 雪子、伊藤 勇一、米山 桂子、齒 さき子、板垣 宏、豊田英一、鈴木 尋之、“The relationship between CD86/CD54 expression and cell viability on in vitro skin sensitization test using THP-1 cells, in the case of water-insoluble chemical”、Society of Toxicology 44th annual meeting、2005.
- 3) 豊田 英一、“動物実験代替法に関する国際動向と開発の現状”、大阪化粧品技術者会セミナー、2004.
- 4) 豊田 英一、“EU における動物実験の規制”、第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会、2004.
- 5) 森 眞輝、穂谷 昌利、杉山 真理子、板垣 宏、豊田 英一、“In vivo 光毒性試験の動物実験代替法としての Yeast-RBC アッセイの開発の提案”、第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会、2004.
- 6) 上月 裕一、山下 富義、市川 秀之、板垣 宏、橋田 充、豊田 英一、“包括的経皮吸収評価法の開発”、第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会、2004.
- 7) 北垣 雅人、若栗 忍、板垣 宏、田中 憲穂、豊田 英一、“急性毒性試験代替法の開発(2)II. 2 施設間における急性毒性試験を予測するための2種の細胞毒性試験の評価”、第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会、2004.
- 8) 若栗 忍、北垣 雅人、板垣 宏、豊田 英一、田中 憲穂、“急性毒性試験代替法の開発(2) I. 2 施設間における2種の細胞毒性試験の安定性”、第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会、2004.
- 9) 豊田 英一、“化粧品リスクアセスメントに関するグローバル動向と課題”、日本化粧品科学会第29回学術大会、2004.

I.知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)

分担研究報告書

「安全性評価のための動物実験代替法の開発および評価体制の確立に関する研究」

「感作性試験代替法の開発」

分担研究者 豊田英一 日本化粧品工業連合会、技術委員会安全性部会長

研究要旨

感作反応は免疫応答に基づく全身系の反応である。従って、複雑な発現機序に基づく感作反応を理論的に *in vitro* 試験法で置き換えることは非常に困難と考えられてきた。そのため、代替法の3RのReductionやRefinementの観点から、マウスを用いるLocal Lymph Node Assay(LLNA)が *ex vivo* 試験法として検討されてきた。Replacementを目的とした *in vitro* 試験法としては、感作性物質が皮膚に曝露された際に生じるランゲルハンス細胞の変化に着目した試験法がいくつか報告されている。その1つとして、ランゲルハンス細胞の代わりにヒト血液から調整された細胞を使用する試験法が検討されているが、用いる細胞の個人差や安全なヒト血液の供給の問題などから、未だ実用に足る試験法は開発されていない。

資生堂と花王はそうした問題を克服することを目的として、血液由来細胞の代わりにヒト細胞株を用いた検討を進め、ヒト細胞株におけるCD86やCD54の発現亢進を指標にした感作性試験代替法を共同開発した。本試験法は、*in vivo*との対応性のみならず施設間再現性という観点からも *in vitro* 皮膚感作性試験代替法として有用である可能性が示された。今後、本厚生労働科学研究班における研究活動により、日本発の国際的な試験法として提案することを目標に、日本独自の研究を遂行して行きたい。

A. 研究目的

感作反応は免疫応答に基づく全身系の反応である。従って、複雑な発現機序に基づく感作反応を理論的に *in vitro* 試験法で置き換えることは非常に困難と考えられてきた。そのため、代替法の3RのReductionやRefinementの観点から、マウスを用いるLocal Lymph Node Assay(LLNA)が *ex vivo* 試験法として検討されてきた。Replacementを目的とした *in vitro* 試験法としては、感作性物質が皮膚に曝露された際に生じるランゲルハンス細胞の変化に着目した試験法がいくつか報告されている。その1つとして、ランゲルハンス細胞の代わりにヒト血液から調整された細胞を使用する試験法が検討されているが、用いる細胞の個人差や安全なヒト血液の供給の問題などから、未だ実用に足る試験法は開発されていない。我々はそうした問題を克服することを目的として、血液由来細胞の代わりにヒト細胞株を用いた検討を進めてきた。

資生堂は、THP-1細胞やU-937細胞が感作性物質と接触すると表面抗原であるCD86が増加すること、およびこの変化を捉えることで感作性物質を評価できる可能性を見出してきた^{1,2)}。

また花王は、THP-1細胞とKG-1細胞において、CD86に加えCD54の発現増強を組み合わせることで、感作性物質をさらに感度良く捉えられることを見出してきた³⁻⁴⁾。

先述のように *in vitro* の皮膚感作性試験代替法は社会全体に大きく貢献できる技術であることから、両社は企業の枠を超え、全世界の研究機関で実施できる試験法を開発することを目的として共同研究を行ってきた。

B. 研究方法

細胞は、THP-1(ヒト単核球細胞株)及びU-937(ヒト組織球リンパ腫細胞株)をATCCより購入して使用した。CD86及びCD54の発現は、上記の細胞に被験物質を処理し、細胞生存率とともにフローサイトメトリーを用いて測定した。(倫理面への配慮)

本研究は感作性試験代替法を開発することにより、実験動物の福祉向上を目指すものであり、ヒトや動物の権利や福祉に抵触するところはない。

C. 研究結果及び考察

C-1 プロトコルの最適化検討

今回の共同研究では、これまで両社が独自に開発してきた試験プロトコルを共有化し、より精度が高く、汎用性も高い試験方法の開発を目指しプロトコルの最適化を行った。具体的に我々が検討した点は、①前培養時間、②被験物質処理時間、③播種する細胞数、④細胞毒性試験(MTT法)による濃度設定、⑤抗体の種類、⑥抗体の処理濃度、⑦非特異的染色を防ぐためのFcレセプターブロックとアイソタイプコントロールの導入などである。これらの項目について、感作性物質と非感作性物質の違いを明確に捉える条件を設定した。

C-1-1 被験物質曝露時間

まず、ヒト細胞株に被験物質を曝露させる時間を検討した(図1)。代表的な感作性物質であるDNCBをTHP-1細胞と一緒に培養し、その曝露時間を8時間から72時間まで変えてそれぞれの処理時間におけるCD86の発現量をフローサイトメトリーにより測定した。低濃度(1 μ g/mL)のDNCBの場合、曝露時間を72時間まで延長してもCD86の発現はコントロールと比較して全く変化がなかった。一方高濃度(3 μ g/mL)のDNCBを処理した場合は、8時間曝露では亢進は見られないものの、その後は24時間後までCD86の発現亢進の上昇が見られ、72時間までほぼその状態を保ち続けた。

以上の結果から、本試験法における曝露時間は24時間あるいは48時間が適切と考えられた。

C-1-2 播種する細胞数の検討

次にTHP-1細胞に被験物質を処理する際の細胞数の検討を行った。24穴プレートに播種する細胞数を1 $\times 10^6$ 個/mLまたは0.5 $\times 10^6$ 個/mLとし、感作性物質であるDNCB、Ni、非感作性物質であるSLSを24時間曝露してCD86あるいはCD54の発現量を測定した(図2)。図2に示すように、DNCBのCD86発現量やNiのCD54発現量は1 $\times 10^6$ 個/mLの方が高かった。一方非感作性物質であるSLSの場合はいずれの細胞数でもCD86、CD54の発現量の亢進は見られなかった。

以上の結果より、本試験法における播種する細胞数は1 $\times 10^6$ 個/mLとした。一般に細胞の活性化はその増殖性と関係があること言われているが、高密度で細胞を播種し、ある程度増殖が抑制されている方が感作性物質による活性化が生じやすい可能性が考えられた。

以上の条件検討結果に、これまでの知見も加味して試験プロトコルを策定した(表1)。

C-2 2施設間バリデーション

C-2-1 バリデーションの概要

決定した試験プロトコルに基づき、我々は2施設間バリデーションを行った。以下にその概要について示す。

- ・細胞株: THP-1
- ・測定指標: CD86、CD54
- ・被験物質処理時間: 24時間
- ・被験物質: 9品(感作性物質6品、非感作性物質3品)
- ・処理濃度: MTT法により求めたIC₅₀(μ g/mL)を基準に、0.1x, 0.5x, 1xおよび2xIC₅₀の4濃度
- ・感作性物質とIC₅₀:
 - DNCB (Dinitrochlorobenzene, 5 μ g/mL),
 - pPD (p-phenylenediamine, 90 μ g/mL),
 - 2-MBT (2-mercaptobenzothiazole, 170 μ g/mL),
 - Ni (nickel sulfate hexahydrate, 170 μ g/mL),
 - Co (cobalt sulfate heptahydrate, 130 μ g/mL),
 - Pt (ammonium tetrachloroplatinate, 100 μ g/mL)
- ・非感作性物質とIC₅₀:
 - SLS (sodium lauryl sulfate, 90 μ g/mL),
 - Tween 80 (1800 μ g/mL),
 - DMSO (dimethyl sulfoxide, 2500 μ g/mL),
 - DMSOは5000 μ g/mLでも細胞毒性が認められなかったため、5000 μ g/mLを最高濃度とした。
- ・測定回数: 各2回(平均値で評価)
- ・被験物質、細胞、抗体および血清は両社で共通のロットを使用

なお測定に用いたフローサイトメトリーは以下の通りである。

施設 A: FACSCalibur (Becton Dickinson)

施設 B: EPICS XL-MCL system II (Beckman Coulter)

C-2-2 バリデーション結果の概要(24時間曝露)

結果の概要を表2に示す。それぞれの施設で測定を2回ずつ行い、平均値を用いて評価した。ただし2回の実験で一度でも生存率が50%未満であった場合は、その濃度のデータを採用しなかった。これは、PI(propidium iodide)染色により生細胞のみを選択しているとはいえ、細胞にダメージが大きい場合は抗体が細胞質中に入ること

で非特異的染色が生じる可能性があるためである⁵⁾。

相対発現量が150%以上を陽性とした場合、CD86では2-MBTが2施設とも陰性となった以外は全ての感作性物質において2施設で陽性となり、逆に非感作性物質で陽性となる化合物は認められなかった。一方CD54では、相対発現量が150%以上を陽性とした場合、pPD以外は全ての感作性物質において2施設とも陽性となったが、非感作性物質であるTween80が陽性となる場合もあった。CD86とCD54を組み合わせた場合、各指標単独では捉えられなかった2-MBTやpPDが陽性となり、*in vivo*試験結果との対応性は2施設とも良好であった。

相対発現量が200%以上を陽性とした場合には、感作性物質において150%以上陽性とする判断基準に較べて検出率は下がるが、非感作性物質はいずれにおいても陰性と判断された。

CD86とCD54を組み合わせた場合には、今回評価した9サンプルでは*in vivo*試験の結果とすべて一致した。また、2施設間再現性は、本試験結果では良好と判断された。

今回の共同研究により、CD86やCD54の発現亢進といったヒト細胞株の活性化を指標にした本試験法が、*in vivo*との対応性のみならず施設間再現性という観点からも*in vitro*皮膚感作性試験代替法として有用である可能性が示された。しかし本試験法が国際的に新たな試験法として正式に認知されるには、試験条件のさらなる改良や多施設間のバリデーション研究など多くの課題も存在している。

今後、本厚生労働科学研究班における研究活動により、日本発の国際的な試験法として提案することを目標に、日本独自の研究を遂行して行きたい。

D. 結論

資生堂と花王は、ヒト細胞株におけるCD86やCD54の発現亢進を指標にした感作性試験代替法を共同開発した。本試験法は、*in vivo*との対応性のみならず施設間再現性という観点からも*in vitro*皮膚感作性試験代替法として有用である可能性が示された。今後、本厚生労働科学研究班における研究活動により、日本発の国際的な試験法として提案することを目標に、日本独自の研究を遂行して行きたい。

E. 健康危険情報

なし

F. 参考文献

- 3) Ashikaga T. *et al.*, *Toxicol. In Vitro*, 16, 711-716 (2002).
- 4) Ashikaga T. *et al.*, Proceedings of the 17th Annual Meeting of Japanese Society of Alternative to Animal Experiments, p74-75 (2003).
- 1) Yoshida Y. *et al.*, *Toxicol In Vitro*, 17, 221-228 (2003).
- 2) Sakaguchi H *et al.*, Proceedings of the 17th Annual Meeting of Japanese Society of Alternative to Animal Experiments, p68-69 (2003).
- 3) Becker D. *et al.* *J. Immunological Methods*, 169, 195~204 (1994).

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 豊田 英一、“動物実験代替法の国際動向とハーモナイゼーション”、FRAGRANCE JOURNAL、33(2)、15-21、2005.
- 2) 豊田 英一、“香粧品リスクアセスメントに関するグローバル動向と課題”、日本香粧品科学会誌、28(4)、288-291、2004.

2. 学会発表(講演及び学会発表)

- 1) 足利 太可雄、坂口 斉、米山 桂子、茵 さき子、宮澤 正明、吉田 雪子、伊藤 勇一、鈴木 尋之、板垣 宏、豊田英一、“Relationship between CD86/CD54 expression and cell viability in *in vitro* skin sensitization test of water-soluble chemicals using THP-1 cells”、Society of Toxicology 44th annual meeting、2005.
- 2) 坂口 斉、足利 太可雄、宮澤 正明、吉田 雪子、伊藤 勇一、米山 桂子、茵 さき子、板垣 宏、豊田英一、鈴木 尋之、“The relationship between CD86/CD54 expression and cell viability on *in vitro* skin sensitization test using THP-1 cells, in the case of water-insoluble chemical”、Society of Toxicology 44th annual meeting、2005.
- 3) 豊田 英一、“動物実験代替法に関する国際動向と開発の現状”、大阪化粧品技術者会セミナー、2004.
- 4) 豊田 英一、“EUにおける動物実験の規制”、第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会、2004.
- 5) 森 眞輝、穂谷 昌利、杉山 真理子、板垣 宏、豊田 英一、“*In vivo* 光毒性試験の動物実験代替法としての Yeast-RBC アッセイの開発の

提案”、第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会、2004.

- 6) 上月 裕一、山下 富義、市川 秀之、板垣 宏、橋田 充、豊田 英一、“包括的経皮吸収評価法の開発”、第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会、2004.
- 7) 北垣 雅人、若栗 忍、板垣 宏、田中 憲穂、豊田 英一、“急性毒性試験代替法の開発(2)II.2 施設間における急性毒性試験を予測するための2種の細胞毒性試験の評価”、第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会、2004.
- 8) 若栗 忍、北垣 雅人、板垣 宏、豊田 英一、田中憲穂、“急性毒性試験代替法の開発(2)I.2 施設間における2種の細胞毒性試験の安定性”、第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会、2004.
- 9) 豊田 英一、“香粧品リスクアセスメントに関するグローバル動向と課題”、日本香粧品科学会第29回学術大会、2004.

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 被験物質曝露時間の影響

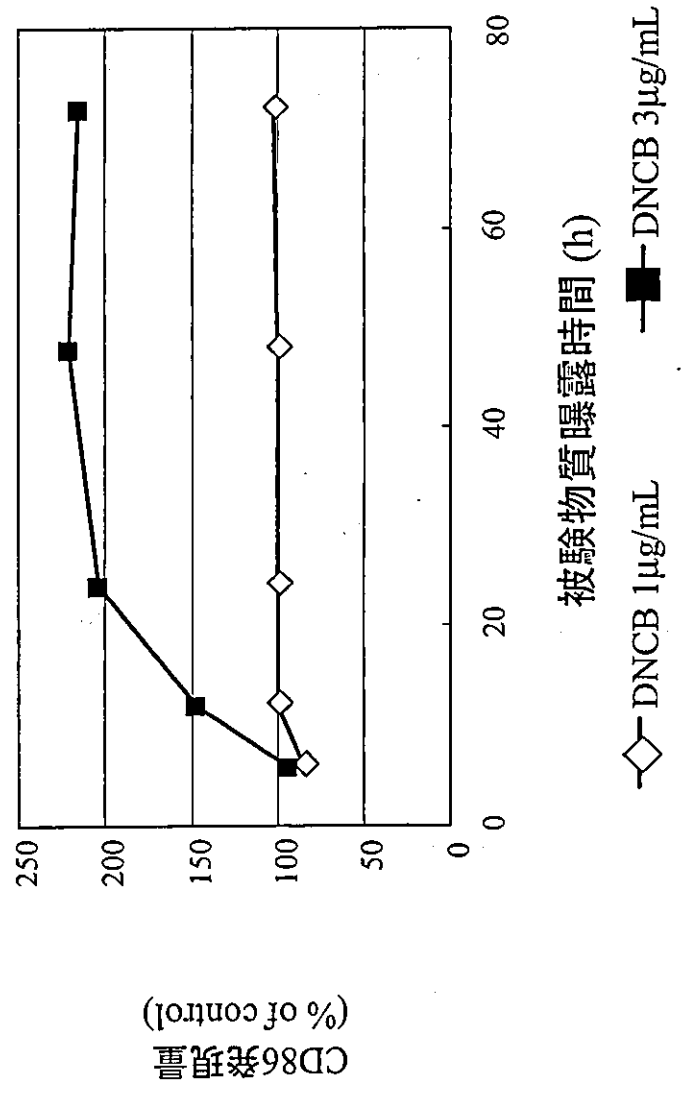


図2 播種する細胞数の検討

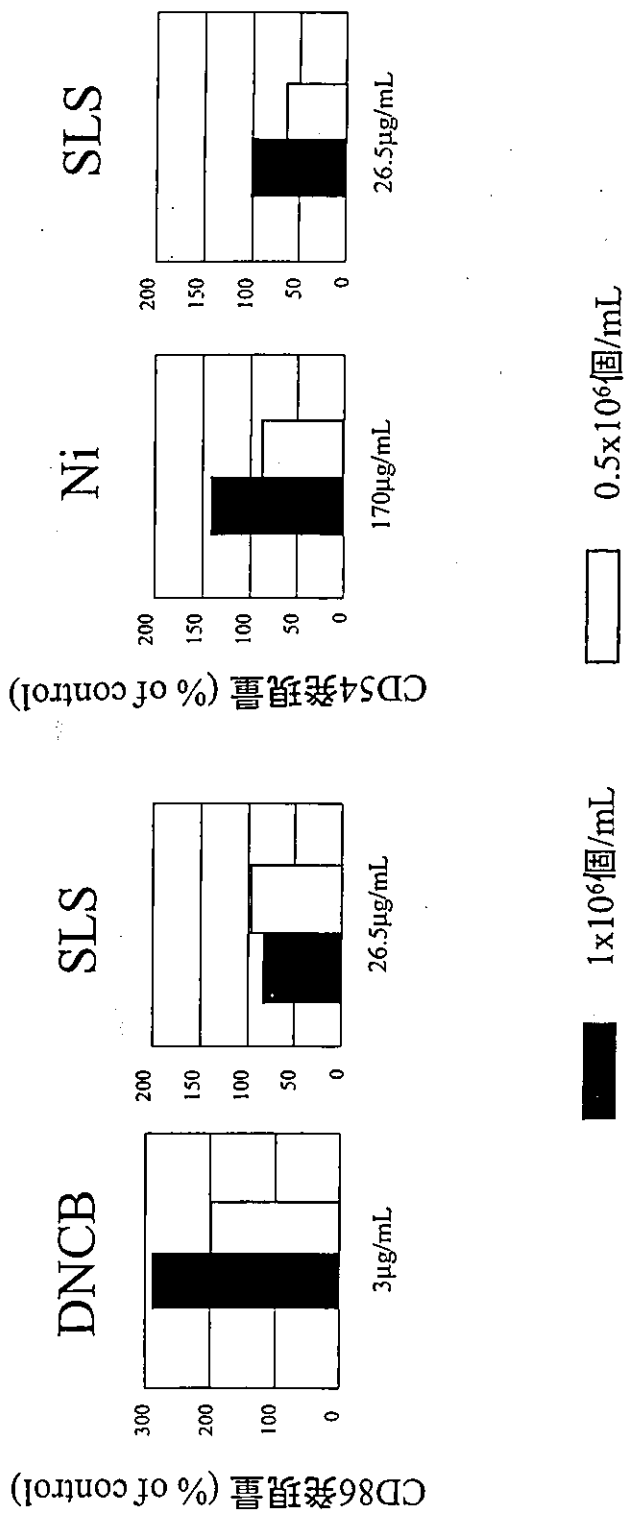


表1. 試験プロトコルの概要

- 1) 細胞毒性試験によるIC50を基準に被験物質曝露4濃度
(0.1xIC50, 0.5xIC50, IC50, 2xIC50)を決定
- 2) 48時間あるいは72時間前培養
- 3) THP-1細胞を 1×10^6 /ml/wellにて播種
- 4) THP-1細胞に被験物質を24時間曝露
- 5) ヒトIgGを用いてFcレセプターブロック
- 6) 抗CD86抗体(BD-PharMingen社製、クローン：FUN-1)、
抗CD54抗体(Dako社製、クローン：6.5B5)および
アイソタイプコントロール(Isotype control, Dako社製)による細胞染色
- 7) フローサイトメトリーによる発現量測定
- 8) 相対発現量の計算

$$\text{相対発現量(\%)} = \frac{\text{被験物質処理細胞のMFI} - \text{被験物質処理細胞でのIsotype controlのMFI}}{\text{溶媒処理細胞のMFI} - \text{溶媒処理細胞でのIsotype controlのMFI}} \times 100$$

MFI: Mean Fluorescence Intensity (平均蛍光強度、ただし平均値は相乗平均を用いて算出した)

表2. バリデーション結果

クライテリア	150%		200%	
	CD86	CD54	CD86	CD54
マーカー				
DNCB	+	+	+	+
pPD	+	um	+	-
2-MBT	-	+	-	+
Ni	+	+	+	+
Co	+	+	um	+
Pt	+	+	-	+
SLS	-	-	-	-
tween 80	-	um	-	-
DMSO	-	-	-	-
<i>In vivo</i> との一致率(%)* (施設A/施設B)	89 / 100		100 / 100	
施設間再現性(%)**	89		100	

In vivo
陽性

In vivo
陰性

+: 2施設で相対発現量がクライテリア以上 - : 2施設で相対発現量がクライテリア未満
 um: un-match: 2施設で異なる結果が得られたケース
 *: CD86とCD54のどちらかの相対発現量がクライテリアを超えた場合を *in vitro* 陽性、いずれも
 クライテリアを超えなかった場合を *in vitro* 陰性とした。
 **: 2施設で *in vitro* 陽性/陰性が一致した割合

代替法開発のための統計解析手法の研究

分担研究者 吉村功（東京理科大学工学部経営工学科，教授）

研究要旨

代替法として開発された *in vitro* 試験において生じた，データ解析法関連問題を検討した。(1) 遺伝毒性や発がん性に閾値が存在するかどうかを判定することについては，*in vitro* 試験で用量反応関係のある関数に限定できるときは，統計学的な判断が可能であるということを事例に基づいて論証した。(2) マウスリンフォーマ試験 (MLA) のデータ解析法については，シミュレーションに基づく検討と実データに基づく検討を通して，大森法が現在考えられるデータ解析法として最良であることを示した。(3) 3次元ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験のデータマネージメントについては，Vitrolife Skin のバリデーション研究において，ミスの起こりにくいデータ入力フォーマットを作成し，実施を行ってその有効性を確認すると共に，データクリーニングの手順書を作成した。(4) 3次元ヒト皮膚モデルにおける評価指標 ET50 の推定法については，シミュレーション研究を行って，ロジスティックモデルと対数線形モデルの併用の有効性を確かめた。また，ET50 を指標とするときの観測時点の設定については，事前情報に基づく観測時点の設定法を提案した。

A. 研究目的

多くの *in vitro* 試験が動物実験代替法として開発されている。そのどれがどの程度動物実験を代替できるか，ということについては，吟味すべきこと，改善すべきことが多く存在している。

その一つが，試験で得られたデータについてどのような統計学的モデルを想定すべきか，どういう指標を用いてどのような統計解析法で被験物質の毒性についての判定を行うべきか，その判定が正しく行われるためにはデータをどのように管理すべきか，データをどのように取得すべきか，という統計学的方法論を確立することである。

本研究では，これに関連して現在問題になっている，(1) 遺伝毒性や発がん性に閾値が存在するかどうかを判定する方法があるか，(2) マウスリンフォーマ試験 (MLA) のデータからどのような統計解析法で陰性・陽性の判定を行うか，(3) 3次元ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験のデータをどのように管理すべきか，(4) 3次元ヒト皮膚モデルにおける評価指標 ET50 を精度良く推定するのに，観測時点をどのように配置し，かつどのような統計解析法で

ET50 を推定すべきか，という4課題を取り上げた。

B. 研究方法

B-1) 閾値検討のための統計解析法

まず，過去に行われた議論，事例に基づいて閾値問題の定式化を行った。次に，発がん性に関した一つの事例を題材にして，閾値推定の方法についての考察を行った。

B-2) MLA の統計解析法

比較する統計解析法として，1次回帰検定，2次回帰検定，ダネット型検定，大森法を対象にした。大森法は，ダネット型検定，Margolin 手順，1次回帰検定を逐次適用する複合手法である。

各統計解析法を適用する際に，用量変数として被験物質用量をそのまま使うのと，用量順位 (rank) を使うのとを比較した。

反応変数として，変異頻度 (mutant frequency; MF) を用いるのと，その対数 (log(MF); LMF) を用いるのとを比較した。

各検定の有意水準を 5% ~ 0.1% までのどの値に設定するのがよいか比較した。

比較のためのデータを2種類用意した。1つはシミュレーションモデルによって発生させた疑似データであり、他の1つは外国の実験施設から提供された約430セットの実データである。

前者については、生存確率に用量依存性がない場合と用量と共に直線的に生存確率が減少する場合のそれぞれについて、4種類の変異頻度パターンを想定し、用量は等間隔の7水準に設定して、1000セットの疑似データを作成した。このデータセットに基づいて、4解析法での第1種の過誤確率と、検出力を検討した。

後者については、アガールMLAの実験データ143セットとマイクロウエルMLAの実験データ255セットに対して、国際的にこの分野の熟達者として知られている3名の研究者の合議判定を真判定とした上で、4解析法での一致率（感度・特異度）を検討した。

B-3) バリデーション研究のデータ管理

まず、日本動物実験代替法学会が組織した「皮膚刺激性試験代替法バリデーション研究」を事例として、データ管理・クリーニングの方法を検討した。次に、この検討結果に基づいて、バリデーション研究のデータ管理とクリーニングを行った。その結果をバリデーション研究の報告として整理した。

B-4) ET50のための観測時点配置と推定法

対象として、3次元ヒト皮膚モデル「Vitrolife Skin」を用いた皮膚刺激性試験の評価指標としてET50を考えた。

現実のバリデーション研究で頻発する、ET50が推定できない実験データにおける推定法として、複数の推定法を逐次用いる方法を考え、この方法の性能を、シミュレーション実験を通して検討した。

さらに、その推定精度をよくするには、どのように測定時点を配置するのがよいかを、シミュレーション実験を通して、検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、統計学的方法論の研究なので、倫理面で特に問題になることはなかった。

C. 研究結果

C-1) 閾値の検討についての統計解析法

閾値を実験的に求めるには、用量 d を複数の水準 d_1, d_2, \dots, d_9 に設定して、反応 Y_1, Y_2, \dots, Y_9 を観測する実験を行うのが標準である。このデータで閾値の有無を検討するには、まず、用量反応関係を表す関数 $y=f(d;\beta)$ を想定する。この関数の中に閾値を表すパラメータを入れる。たとえば直線回帰であれば、勾配が正で切片が負であることが閾値の存在を意味する。問題の定式化においては、このように、閾値を表すパラメータを入れたモデルを想定するのが統計学的接近法である。

このように問題を設定したとき、統計学的に閾値の有無を判定することは、パラメータについての帰無仮説を、ある対立仮説において十分な検出力で棄却する問題となる。この問題は、対立仮説を限定しない限り有限のサンプルサイズでは解答できない。したがって、閾値の有無を統計的方法で判定するには、用量反応関係を生物学的に限定することが必要になる。たとえば、平林ら(2003)は、このような限定したモデルでの選択を通して、閾値の存在についての主張を行っている。本研究では、このやり方で問題に接近するのが統計的に閾値問題を扱う一つの方法論であるということを示した。

C-2) MLAの統計解析法

C-2-1) シミュレーションモデルに基づく検討

第1種の過誤（実質有意水準）を1%に共通に設定したときの検出力は、用量反応パターンに依存して変わるが、 $2 \times 4 = 8$ パターンの全体に対して比較的共通に高い検出力を保っていたのは、2次回帰検定で、以下が、大森法、Dunnett型検定、1次回帰検定の順であった。

C-2-2) 実データに基づく検討

一致度を評価指標にした場合、性能の良さは、大森法、Dunnett型検定、1次回帰検定、2次回帰検定の順であった。

実質有意水準は0.3%~0.1%が最良であった。

用量変数は用量そのままでも順位変換をしたものでも、大差なかった。

反応変数はMFそのままでも、対数を取ったLMFでも、大差なかった。

マイクロエル MLAの方が、一般にagarMLAより高い検出力を保持していた。

C-3) データマネージメント

データの質管理における最大の問題点は、誤入力である。すべてのデータ解析は生データが正しいものとして行われるので、誤入力を防ぐのが、データマネージメントの最大課題である。これを防ぐために、(1) 入力に記入漏れがある場合には警告を出す、(2) 不要な入力は受け付けない、(3) 選択肢が限られている場合はメニューから選択させる、(4) GLP 準拠の紙出力との照合を行う、ことを条件に入れた記入シートを用意して、データの提出を行うことにした。結果として、従来の経験よりかなり誤記入を減少させることができた。それでも提出後のチェックで1%程度の誤記入が見いだされた。

C-4) ET50 推定法とそのための観測時点設定法

用量反応関係として、吸光度に対するロジスティックモデルを想定し、最小二乗法で推定したとき、実際に推定値が得られるのは、全体の63%程度であり、他の場合には推定値が得られないことが分かった。そこで、ロジスティック回帰法で推定値が求まらないときは、対数直線法を用いるという方法を考案したところ、推定値が得られる場合が、97%まで上昇した。

ここで対象としている Vitrolife Skin を用いた試験は、実験の進め方や費用・労力の関係で、ET50が推定可能という範囲で、選択する時点数をなるべく小さくしたい。そのために必要な時点数と測定時点の検討を行ったところ、時点数としては少なくとも4時点、できれば最低でも5時点が望ましい、という結果になった。測定時点が4時点の場合は、測定時点として、1時間後と24時間後という両端の他に、予想されるET50値の前後に2時間外れたところで測定を行うことが望ましい。もし、5時点の測定が可能であれば、予想ET50の時点でも測定を行うのが精度上望ましいことが分かった。

D. 考察

D-1) 閾値の検討についての統計解析法

前節の結果は、閾値の有無の判定問題を、モデル選択の問題としている。このとき、その判定方法は十分な精度を持っているかどうかの吟味が必要となる。結論を言うと、学問的・社会的批判に耐えうる性能を持つ *in vivo* 実験を計画するのは困難である。必要なサンプルサイズが非常に大きくなり、現実的でなくなるからである。これに比べて *in vitro* 試験であればサンプルサイズの制約はかなり緩くなる。そのかわり *in vitro* 試験での結果が生体での結果を反映するものかどうかの疑問が生じる。これについての解答は現在のところ存在していない。

D-2) MLA の統計解析法

シミュレーションに基づく検討では、2次回帰検定が最良で大森法がそれにつぐ検出力を保持していたのに対し、実データに基づく検討では、大森法が最良で2次回帰検定が最も性能が悪かった。この食い違いの理由として、統計モデルでの陰性の定義と毒性試験家の考えている陰性の定義の食い違いが考えられた。すなわち、生体にはある種の防御機構、修復機構があるため、反応の大きさがあるレベル以下である場合には、生物個体はそれを毒性発現に至らせない。毒性試験家はそのような例を通して、被験物質の陽性・陰性を判断し、その判断に適合した用量反応関係を評価している。これは小さな毒性発現を陰性とすることになる。

これがシミュレーションに基づく統計的判定と実データに基づく毒性家の判定との食い違いの原因であるならば、どちらの判断を優先すべきであるかが問題になる。被験物質の毒性の有無を、生体への影響で捉えるなら、実データに基づく毒性家の判定により合致する方法をデータ解析法として用いるのが合理的であろう。

D-3) データマネージメント

記入シートの工夫によって誤記入は大幅に減少させることはできたが、チェックは必要であった。そこでチェックのための手順書を先例にならって作成し、チェックを

行い、データクリーニングを行ったところ、後のデータ解析で生データを確認することがほとんど不要となった。

一通りのデータ解析を行った後で、データ検討会を開き、実験参加者の意見を確かめたところ、実験手順書の不遵守による過剰なデータの存在が分かった。今後のバリデーションにおいては、手順の遵守と、不遵守への対処も、事前に解析計画に入れておくべきである、ということが分かった。

D-4) ET50 推定法とそのための観測時点設定法

ET50 については、点推定より信頼区間の構成法が重要である。信頼区間については、被覆確率が名義信頼水準に近いことが必要であるが、検討した方法では、それが保持できないことが多いことが分かった。どちらかというと自由的 (liberal) になる傾向がある。これをどのようにして補正するかは、今後の研究課題である。

E. 結論

E-1) 遺伝毒性や発がん性に閾値が存在するかどうかを判定することについては、*in vitro* 試験で用量反応関係のある関数に限定できるときは、統計学的な判断が可能であるということを事例に基づいて論証した。

E-2) マウスリンフォーマ試験 (MLA) のデータ解析法については、シミュレーションに基づく検討と実データに基づく検討を通して、大森法が現在考えられるデータ解析法として最良であることを示した。

E-3) 3次元ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験のデータマネージメントについては、Vitrolife Skin のバリデーション研究において、ミスが起こりにくいデータ入力フォーマットを作成し、実施を行ってその有効性を確認すると共に、データクリーニングの手順書を作成した。

E-4) 3次元ヒト皮膚モデルにおける評価指標 ET50 の推定法については、ロシミュレーション研究を行って、ロジスティックモデルと対数線形モデルの併用の有効性を確かめた。また、ET50 を指標とするときの観測時点の設定については、事前情報に基づく観測時点の設定法を考案した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- 1) 西山智, 柳原宏和, 吉村功. 最大対比法を活用するための SAS/IML プログラム. 計量生物学, 24, 57--70, 2004.
- 2) 西山智, 吉村功. 複合最大対比法の提案とその毒性試験データ解析への応用. 計量生物学, 25, 1--8, 2004.
- 3) Chiba Y., Matsuyama Y., Sato T., Yoshimura I. A simulation study for a linear measurement error model when error variances varied between measurements. Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics (To appear), 2005.

G-2. 学会発表

- 1) 吉村功. 生物統計の視点から考えられる閾値問題. 第31回日本トキシコロジー学会学術年会, 大阪国際会議場, 大阪, 2004. 7. 6--8.
- 2) 吉村功. 統計家からの疑問- インビトロ試験のデータから定量的結論を導く音は邪道か?. 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会, 長崎ブリックホール, 長崎, 2004. 11. 30- 12. 2.
- 3) 白石亜矢子他. 皮膚刺激性試験代替法としての Vitrolife-skin のバリデーション研究. 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会, 長崎ブリックホール, 長崎, 2004. 11. 30- 12. 2.
- 4) 大野泰雄他. 皮膚三次元モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法のバリデーション. 日本代替法学会学術年会, 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会, 長崎ブリックホール, 長崎, 2004. 11. 30- 12. 2.
- 5) 田中憲徳他. 酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験を用いた光毒性試験バッテリーのバリデーション及び評価委員会での検討中間報告. 日本代替法学会学術年会, 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会, 長崎ブリックホール, 長崎, 2004. 11. 30- 12. 2.

6) 吉村功他. 酵母赤血球試験の光毒性試験代替法としてのバリデーション研究. 日本代替法学会学術年会, 第33回日本環境変異原学会第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会, 長崎ブリックホール, 長崎, 2004. 11. 30--12. 2.

G-3. 参考文献

1. Hirabayashi Y., Yoshida K., Arizawa S., Kodama Y., Knnno J., Kurokawa Y., Yoshimura I., Inoue T. (2003) Evaluation of nonthreshold leukemogenic response to methyl nitrosourea in p53-deficient C3H/He mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 190, 251-261.

H. 知的所有権の取得状況
無

I. 謝辞

本研究の遂行にあたっては, 国立医薬品食品研究所の, 林真博士, 本間正充博士, 京都大学大学院医学系研究科の大森崇助教授, 千葉康敬助手, 東京理科大学大学院工学研究科学生, 寒水孝司氏, 佐藤真理氏, 白石亜矢子氏, 西山智氏 (現在武田薬品工業), 東京理科大学工学部学生の兵頭洋平氏, 高沼正幸氏, メナード化粧品株式会社の小島肇夫氏, 川端留美氏, その他バリデーション研究参加者全員の協力を得た。ここに記して感謝の意を表する。

バリデーショndataの統計解析

分担研究者：大森崇 京都大学医学部 助教授

研究要旨

- ・ [背景と目的] バリデーション研究では、複数の施設が同じ手順に従い実験を行うので、結果を報告する際には、データの記載方法を統一する必要がある。しかしながら、この認識は十分に理解されていない。日本で過去に実施された眼刺激性代替法バリデーション研究では、データクリーニング作業に2年の歳月を費やす結果となった。近年行われた光毒性試験代替法バリデーション研究ではこの経験を反映させて、研究前からデータクリーニングの準備が行われた。この研究では、光毒性試験代替法バリデーション研究のデータクリーニングで、どのような準備を行ったかを示すこと、眼刺激性試験代替法のバリデーション研究との結果を比べること、結果を踏まえて今後の代替法バリデーション研究のデータクリーニング作業への提言を行うことを目的とする。
- ・ [方法] 試験前にデータ記入のためのデータシートファイルを作成することにした。これらのデータシートファイルをチェックし、誤りや不明な点がある場合は問い合わせを行いこととした。問い合わせの項目を眼刺激性試験代替法バリデーション研究のデータクリーニングと同じ項目を用いることで、効果を計ることとした。
- ・ [結果] データシートファイルは眼刺激性代替法バリデーション研究のデータクリーニング結果の考察を生かし作成された。結果は、眼刺激性試験代替法バリデーション研究での提出ファイル数に対する問い合わせのベファイル数が1.13倍（1535/1742）であったのに比べ、光毒性試験代替法バリデーション研究では0.53（222/420）であった。また、問い合わせ項目の割合は2つの研究で大きく異なっていた。
- ・ [結論] 上記の結果は、2つの研究のさまざまな違いを考慮しても、バリデーション研究を開始する前から研究の計画段階から準備を行うことが有効であることを示している。バリデーション研究を実施する際には、データファイルシートを工夫する、技術移転でデータの入力についての説明する、誤解のないようにプロトコル・実施手順書・データファイルシートを吟味する、データクリーニングの手順を確立する、などのことが必要であることが参加者全員に広く認識されるべきである。

A. 研究目的

本研究は、動物実験代替法開発におけるバ

リデーション研究（以下、バリデーション研究）において、現時点において具体的に必要

とされている統計解析における諸問題について検討を行う。この検討は、3年間でデータマネジメント、データ解析方法、研究の計画について検討を行う予定であり、本年度はデータマネジメントについての検討を行ったのでその結果を報告する。

通常、バリデーション研究の研究手順は、新たに開発された試験方法について、試験方法の手順書が作成され、その手順書に基づき *in vivo* 試験の成績が知られている複数の物質を用いて、複数の施設で実施した試験結果の再現性や *in vivo* 試験の予測能力などが検討される。これらの検討は、複数の施設で行われた試験結果を一箇所の施設に集めて評価されることになる。もしも複数の施設で実施する研究ではなく、単に個々の施設のみでの試験結果を報告する研究であるならば、試験結果として得られるデータの扱い、つまり、測定値の記入方法やまとめ方などは、施設独自のものであっても特に大きな問題は生じないであろう。しかしながら、バリデーション研究を行う場合には、複数の施設が共通の試験を実施するため、試験手順書のみならず、得られるデータの記録方法なども統一する必要がある。

残念なことにデータの記録方法の統一が重要であることは十分には認識されていない。このことを示す一つの例は、過去に日本で実施された47の試験実施施設が参加した大規模な眼刺激性試験代替法のバリデーション研究であろう。この研究では、事前におおまかな記録方法が設定されていたにもかかわらず、個々の試験実施施設から提出されたデータは、記載方法が統一されていない、必要なデータが記載されていないといったものであった。これらのデータを、最終的な結果を導く

ためのデータベースを作成するために、この研究の研究者は2年以上のデータクリーニング作業を費やすことになった。この経験は、施設から集められるデータに誤りがなく、集められたデータからデータベースを作成するまでに実施するデータクリーニングをいかに効率よく実施するかが、バリデーション研究を実施する際の一つの課題であることを示しているといえる。

近年多くの代替法のバリデーション研究の結果が報告されているが、報告の中にデータクリーニングやデータマネジメントについて記載されているものは少なく、記述してある場合でも詳細は記載されていない。また、わが国で実施された眼刺激性試験代替法のバリデーション研究以外でデータクリーニングやデータマネジメントについて記載している文献はほとんどない。

現在、わが国では光毒性試験代替法のバリデーション研究が行われ、その研究成果は厚生労働科学研究報告書（大野（2004））で報告されているが、このバリデーション研究では、過去に実施された眼刺激性試験代替法のバリデーション研究の経験を踏まえ、施設から集められるデータに誤りを少なくし、集められたデータからデータベースを作成するまでに実施するデータクリーニングの効率を高めることが課題の一つとされていた。

本研究では、

- 光毒性試験代替法で、眼刺激性試験代替法のデータクリーニングの経験を反映させた点を明示すること、
- このバリデーション研究におけるデータクリーニングの結果を眼刺激性試験代替法バリデーション研究のデータクリーニングの結果と比較した結果を示すこと、

- ・ さらに、今後のバリデーション研究でのデータクリーニングのあり方について提言を行うことを目的とする。

B. 研究方法

B. 1. 眼刺激性試験代替法バリデーション研究のデータクリーニングの要約

試験の概要やデータクリーニングの詳細はすでに報告されている (Ohno ら (1995)、Omori ら (1995))。ここではこれらの文献の要約を示す。

先に示した眼刺激性試験代替法のバリデーション研究では、7種類の被験物質を用いて、16種類の細胞毒性試験が評価された。試験実施施設数は47施設であった。ただし、すべての施設がすべての代替法を評価したわけではない。物質ごとに用量と吸光度を含む試験結果が記録された電子媒体のデータファイルが各施設から提出され、全部で1,535のデータが集められた。データクリーニングにより、何らかの問合せや訂正を行うこととなったファイル数は、のべ1,742データファイルとなった。

多くのデータファイルが問合せや訂正となった理由を探るために、問合せや訂正の内容は以下に示す項目に分類された。

- (1) 細胞毒性の指標を計算するために必要なデータが入力されていない (44%)
- (2) 規定したフォーマット形式にデータが入力されていない (19%)
- (3) プロトコルや事前に決められたルールに適合していない (17%)
- (4) 単純な入力ミス (7%)
- (5) 試験実施施設からの誤りであったとの報告 (6%)

- (6) 紙媒体で提出されたデータと入力された結果が一致しない (5%)

- (7) その他 (2%)

() 内のパーセントは、のべ問合せ数についての割合を示しており、このうち(1)から(3)までの内容が、全体の約80%を占めていた。さらに、それらの項目が多くなっている原因として、

- ・ 個々の試験法に適したデータファイルのフォーマットがきちんと定められていない、
- ・ データシートの入力方法に多くの誤解があった、
- ・ プロトコルで用いられた用語が誤解されやすく、試験によりその定義が異なっていた、

ことなどが考察されている。

B. 2. 光毒性試験代替法のバリデーション研究の各試験方法

新たに実施された光毒性試験代替法のバリデーション研究の対象となっている試験法は、酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験の2つの試験法を実施して、両方の結果に基づき光毒性を判定するという方法である。したがって、2種類の試験法がすべての試験実施施設数で実施される。試験実施施設は6施設で、9種類の被験物質が評価された。この研究では研究計画書が作成されており、そこでは、各施設が1回の試験結果を2回以上実施して提出することとなっている。個々の試験法については、Sugiyama ら (1994a)、Sugiyama ら (1994b)、Sugiyama ら (2002)、大野 (2004) に詳細が記載されているが、データクリーニングの説明と、バリデーション試験の研究手順書での決められていたこととして必要とな