

る最小限の記載を以下に示す。

#### 酵母光生育阻害試験

酵母を用いて試験法であり、照射、非照射それぞれの条件下で、濾紙に含ませた被験物質の曝露により酵母の寒天培地上で得られる阻止帯の長さが試験の評価項目となる。この試験では、1物質あたり4濃度が、溶媒対照、陽性対照とともに6穴プレートが用いられる。これらが2系列で実施され、それらについてそれぞれ照射した場合と非照射の場合とで行われるため、1回の試験で6穴プレートは4枚分の結果が得られることになる。

#### 赤血球光溶血試験

赤血球を用いた試験法であり、照射、非照射のそれぞれの条件下で、完全溶血に対する被験物質投与により溶血した度合が評価項目となる。この試験では1物質あたり4濃度が、溶媒対照、完全溶血、PBS(-)添加対照とともに実施される。24穴プレートが使用されるため、最大で3物質を同時に実施することができる。これらが照射、非照射についてそれぞれ2系列で実施される。溶血度の測定は、上清を96穴プレート2枚に複製して移し、吸光度計により行われる。24穴プレート1枚分の照射、非照射の結果を96穴プレートで測定するため、1回の試験で96穴プレートは4枚分の結果が得られることになる。このバリデーション研究では、540nmの波長で測定された吸光度が主解析として採用されることになっているが、525nm かもしくはそれに近い波長も同時に測定され報告することとされていた。

#### B. 3. データファイルシートの作成と説明

先に記したように、光毒性代替法バリデーション研究では、短期間で研究結果を示すようにするために、眼刺激性試験代替法バリデーション研究の経験を反映させるようなデータ収集方法が必要であった。このため、実験結果を記入する各施設の実験実施者が、誤りや誤解することなくデータを記入するための電子媒体のデータシートファイルを作成した。

データシートファイルについて実験実施者に理解が得られるように作成したデータシートファイルとその入力方法をバリデーション研究の技術移転の際に時間を設けて各試験実施者に説明した。また、各施設に入力用のデータシートファイルを配布する際に、入力例を示したデータシートファイルを配布した。このバリデーション研究では、技術移転に参加しないものは試験を実施する資格を与えられなかった。

#### B. 4. データクリーニングの範囲と手順

光毒性試験バリデーション研究では、データが正しく入力されているかどうかを確認するためにデータシートファイルとは別にデータシートファイルに入力する基となったデータの紙媒体での提出を求めた。これら紙媒体のデータは試験実施中に試験実施者が測定した値の記入や、吸光度計から得られるプリントアウトである。酵母光生育阻害試験で阻止帯の長さを測定するノギスや、赤血球光溶血試験で用いられる吸光度計の種類は施設により異なるため、紙媒体の資料を統一することはしなかった。データクリーニングは、紙媒体に基づき、データシートファイルの入力項目の中の被験物質名、本試験・予備試験の有無、試験回数、系列、測定値、吸光度の波長(赤血球光溶血試験の場合のみ)がチェック

の対象とされた。データシートファイルで入力が必要な施設名、実施者、溶媒名、用量の値などはデータファイルに入力されているかはチェックの時点で確認するものの、紙媒体との一致を求めるまでのチェックは行っていない。

眼刺激性試験代替法のバリデーション研究では、データクリーニングの手順について特に事前に定められた規定はなかった。この研究ではデータクリーニングの作業を効率よく行うために、施設からのデータが提出される以前にデータクリーニングの手順を確立した。この手順では、原則として施設から届いたデータシートファイルのクリーニングを1週間以内に実施すること、疑問が生じたデータは電子メールで確認を行うことなどが決められた。また、データクリーニングのための各データシートファイルシートのチェックリストを作成しチェックを行った。

#### B.5 2つのバリデーション研究のデータクリーニングの比較検討法

上記のように準備をしたデータクリーニングの手順が有効か否かを確認するために、この研究では、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作業で用いられた分類に沿った以下の項目に該当したデータファイルのべファイル数を調べることにした。これにより、眼刺激性試験代替法バリデーション研究の時のデータクリーニング作業で生じた問題の内容の質がこのバリデーション研究でどのように異なっているかをおおまかに比較することができる。そこで、この研究では各問い合わせの以下の項目に分類した。

すなわち

- (1) 何らかの必要なデータが入力されていない
  - (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
  - (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
  - (4) 単純な入力ミス
  - (5) 試験実施施設からの誤りであったとの報告
  - (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
  - (7) その他
- である。

度数は、問合せ回数とその問合せに該当するファイル数とする。後者は眼刺激性試験代替法バリデーション研究の場合の数え方に対応している。

### C. 研究結果

#### C.1. 作成したデータファイル

光毒性試験バリデーション研究で作成したデータファイルについて記載する。

データシートファイルは Microsoft 社の Excel2002 を用いた。Excel を用いた利点は、このソフトウェアの(1)汎用性—どの試験実施施設でも利用することができ操作に慣れていること、(2)その機能—シートの保護、入力規制、表計算機能、によっている。

眼刺激性試験代替法バリデーション研究の経験を具体化するために、以下の点を考慮してデータシートファイルを作成した。

- (1) 酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験のそれぞれ異なるデータシートファイルを作成した。
- ・どちらの試験のデータシートファイルも、1回の試験の1系列分の照射と非照射につい

て1データシートファイルに入力されるようにした。

- ・1つのデータシートファイルには、施設名、被験物質、溶媒対照、濃度、測定値などの情報を入力するようにした。
- (2) 試験実施者がデータシートファイルのどの位置に何を入力するのかということを理解しやすいようにした。
- ・試験をしている状態に合うように、プレートの形に沿った入力方法とした。
  - ・入力に必要な箇所は色をつけた。
  - ・マウスを近づけると何を入力すべきかのコメントが表示されるようにした。
- (3) 誤った入力や予期しない入力をなくすようにした。
- ・施設名や溶媒など事前に規定されているものは、選択できるようにして、入力できないようにした。
  - ・数値の入力のところには数値以外は入力できないようにした。
  - ・入力する必要のない場所には入力できないようにした。
  - ・シートが改変されないように注記した。
- (4) 各試験実施者による試験の結果の確認ができるようにした。
- ・同じファイルの別のワークシートに照射と非照射の結果から得られる光毒性の判定が示されるようにした。

データシートは技術移転の際に説明された。この際、赤血球光溶血試験のデータシートファイルは、各施設の吸光度計の出力をカットアンドペーストできるように改変することが提案され、改変がされた。

最終的に使用されたデータファイルシートを図1、図2に示す。

<図1 酵母光生育阻害試験のデータシートファイル>

<図2 赤血球光溶血試験のデータシートファイル>

### C.2. 提出されたデータファイル数

提出されたデータシートファイル数を表1に示す。

<表1 提出されたデータシートファイル数>

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験で、データファイル数が異なる理由は、試験回数それぞれの試験法で統一するという研究計画書になっていないこと、赤血球光溶血試験では、1枚のデータシートファイルに最高3物質分のデータを入力することが可能なこと、赤血球光溶血試験では540nmの波長で測定された吸光度のデータと、525nmもしくはそれに近い波長で測定された吸光度のデータは別に入力されるためである。

### C.3. データクリーニング作業の結果

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項目について、問い合わせ回数と該当データファイル数を表2に示す。

<表2 各データクリーニング項目における問合せ回数と該当データファイル数>

表1と表2からわかるように、光毒性代替バリデーション研究で集められたデータファ

イル数は合計 420 ファイルであり、問合せをしたのベデータファイル数（表中 11）が 222 ファイルであった。

眼刺激性試験代替法試験では、集められたファイル数に比べ問い合わせのベファイル数が上回っていたことと比べると問い合わせの数は減らしていることがわかる。また、特に眼刺激性試験代替法のバリデーション研究で問題となった項目は少なくなっており質的に問い合わせの内容が異なった結果となっていたと考えられる。

特に、「(7) その他」とした項目の問い合わせファイル数が多くなっている。この項目の具体的な内容を表 3 に示す。

#### <表 3 データクリーニングで問い合わせた内容>

表 3 の内容から、データシートファイルの設計段階では予想しきれなかったことが生じていることがわかる。これらは今後のバリデーション研究に生かされるべきであろう。

### D. 議論

#### D. 1. 眼刺激性試験代替法バリデーション研究におけるデータクリーニングの内容との相違

本研究の結果は、眼刺激性試験代替法バリデーション研究でのデータクリーニングで作成された分類に基づき、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の結果をまとめることで、データシートを作成した効果を評価している。結果は、事前にデータシートファイルを作成したことで、問い合わせの割合は減少し、眼刺激性試験代替法で問題となった問合せ項目を減少させていると考

えられる。ただし、2 つの研究を比較する場合にさまざまな状況がかなり異なっていることに注意する必要があるであろう。

- ・ 時間の違いを含めた環境要因（例えば、眼刺激性試験代替法バリデーション研究を行った時には Excel の普及ほとんどの施設で用いていなかった）
- ・ 試験実施施設の数
- ・ 試験方法の違い
- ・ データクリーニングの範囲

などである。したがって、本稿では、データクリーニングの効率が何%改善したという定量的な議論を行うことはしていない。上記の要因をそろえた公正な比較を行うには、実験的な研究を行うことであろうが、そのような研究を実施することは、現実には困難であるだけでなく、実際の研究の場で生じる諸問題を反映できるとも思えない。したがって、この研究では、様々な要因が異なるということも考慮した上で、眼刺激性試験代替法バリデーション研究の経験を生かしたデータシートファイルの設計とその効果を評価せざるをえない。上記のような限界を考慮したとしても、「(1) 必要なデータがない」ということが一切なく、「(2) 規定したフォーマットで送付されていない」というものがわずか 1 ファイルのみ（誤って送信された）であったことは、試験開始前からデータクリーニングを意識し検討を行い、その準備をすることがバリデーション研究を実施する際に重要であることを示していると考えられる。

#### D. 2. データクリーニング作業の効率

眼刺激性試験代替法バリデーション研究で 2 年以上の時間を費やしたデータクリーニング作業をいかに効率よく短時間で行うかは、

光毒性試験代替法バリデーション研究を始める段階で大きな課題であった。この点を改善するために、我々は事前にデータクリーニングの手順を確立した。施設から提出されるデータにどのような疑問が生じるかは不明であったが、眼刺激性試験代替法のバリデーション研究で報告された問合せの項目から想定される疑問や問合せ事項を予測したものから作成した、1 データファイルに1枚の簡単なチェックシートを用いてデータクリーニングの作業を進めた。各施設から送られてきた試験結果の時間差があったこともあり、送付されてから1週間以内に送付されたデータシートファイルのデータクリーニングに着手ができた。また、問合せの返答の2日以内に確認や訂正作業を実施することができた。手順の確立とチェックリストの作成の効果を比較することは不可能であるが、データクリーニング作業の効率という点についてかなり貢献したと考えている。このことは、第三者が研究の評価を行う際に実際に行ったデータクリーニング作業の範囲を示すこともできる利点もある。一方で、チェックリストの作成は、チェックリストにない項目の誤りを見落とす可能性がある。しかし、データクリーニング作業が長くなれば、担当者が担当を変わってしまい、連絡がつかなくなるなどということも起こりうる。また、いかなる場合においても完全なチェックなどというのは不可能であるのだから、長い時間をかければよいということとは決していないであろう。

作業の確立やチェックリストを作成するためには、どのような誤りが生じうるかということ予測する必要がある。そのためには、過去の研究の経験やその研究の試験実施計画書の把握は重要である。研究の参加者全員の

データクリーニングへの認識が必要である。

#### D. 3. 試験の複雑さの影響

16 試験を評価した眼刺激性試験代替法バリデーション研究では、複雑な試験法ほどデータクリーニングで問合せや訂正を行うデータシートファイル数が多い傾向があった。このバリデーション研究でも、酵母光生育阻害試験に比べて赤血球光溶血試験は操作やデータの入力方法が複雑である。これは表2の問合せの度数やデータシートファイル数でもその傾向がうかがえる。特に、赤血球光溶血試験のプロトコル逸脱であったデータシートファイル数は48ファイルあったが、これは1施設がプロトコルを誤解したために生じたものであった。広く普及する代替法を考える場合には試験法の簡易さというのは重要な要因となるであろうが、これはデータの質の確保という点からも認識されるべきである。

研究計画書や試験実施手順書などは、誤解がなく、理解しやすくなるように再考を重ねるべきである。試験計画時に、そのための時間を確保するように心がけるべきである。

#### D. 4. 改善すべき課題

データクリーニング作業における我々の最終的な目標は、眼刺激性試験代替法バリデーション研究に比べて何%問い合わせ数が改善したかではなく、問い合わせ数がなくなるようにするような方法論を構築していくことであろう。本稿で記したような計画段階からデータクリーニングを考慮した光毒性代替法バリデーション研究でも、データクリーニング作業で完全には問合せや訂正のデータファイルをなくすことができていない。この研究のデータクリーニング作業を通して、今後の研究

で参考になるであろう、改善できる点を以下に考察する。

#### データシートファイルへの対応

赤血球光溶血試験では、3つの被験物質を同時に試験することが可能である。この研究では、試験をするプレートを意識してデータシートファイルを作成したため、1枚のシートで最高3物質分の結果を入力することを可能とした。しかし、1物質のみしか入力しない場合の空いた欄についての処理をどのような入力とするかは規定していなかった。このため施設により、その施設には配布されない被験物質のコードを選択したり、ブランクの値を入力したりするという異なる対応が取られ、問合せの対象となっている。データシートファイルの設計時に被験物質が1,2物質の場合の入力方法を考えておくべきであった。

#### 試験実施手順書の用語

データクリーニング作業を通じて、プロトコルからの逸脱が1つみつかった。赤血球光溶血試験で24穴プレートから96穴プレートに移す際に2系列に移すことが実施されていなかったのである。赤血球光溶血試験の実施手順書には、24穴プレートで試験を行う際にduplicateで実施する旨が記載されており、さらに24穴プレートから96穴プレートに移す際もduplicateという用語が用いられていた。同じ用語を使用した施設の試験実施者にプロトコルからの逸脱を起こさせる要因となった可能性は大きい。また、ある施設は系列という用語の誤解をしていることがわかったため、データクリーニングの段階で入力しなおす作業が生じた。これは、上記の他に実施手順書で「duplicate」という記載がなされ、

データシートファイルでは同じことを「系列」と記載していたことによるかもしれない。プロトコル等で用いる用語に注意すべきであることは眼刺激性試験代替法のバリデーション研究の反省としても報告されていることである。研究が始まる前の試験プロトコル、試験手順書の確認の際には、用語の定義や書類によって異なる使い方がされていないかも含めて検討されるべきであろう。

#### その他：ファイル数の不必要な増加

1つは系列を別にデータシートファイルに分けてしまったことである。これはデータシートファイルを作成した当初1ページに収めるようにデータシートファイルを作成したためであったが、技術的にはそのようにする必要はまったくなかった。系列ごとのデータシートファイルとしてしまったことで試験実施者にとってはそれぞれの系列に対応したファイルを作成するために同じ用量の値と同じ実施者を入力し、同じ項目を選択する必要があった。さらにデータクリーニングを行う側からすれば、それぞれのファイルにアクセスし、ファイル名を管理する必要が生じてしまった。2つの系列を1つのデータシートファイルにしておけば、データクリーニングの対象となるファイル数は半分にすることができ、後のデータ解析のためのデータベースの構築もよりスムーズにできたはずである。1つのデータファイルにどれだけの試験結果を含めるべきかを実施前に十分に検討すべきであろう。

#### E. 結論

以上の点を踏まえ、本研究を通じての我々の結論と今後のバリデーション研究への提言を以下に示す。

多くの施設が試験を実施するバリデーション研究では、信頼のおける研究結果を得るためにデータクリーニングは必ず必要である。この作業は短期間で完了し、問合せや訂正が少ないことが望ましい。そのためには、研究の計画段階で

- ・ 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ール、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
- することは効果的である。そして、このことはバリデーション研究に参加する者全員が理解すべきである。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

参考文献

- ・ 大野泰雄 (2004). 厚生労働科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業) 分担研究報告書光毒性試験代替法の評価とバリデーション
- ・ Ohno, T., et al. (1995). Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE I. Overview of the study and analyses of validations of ED50 values, *Alternative Animal Testing and Experimentation*, 5, pp. 1-38.
- ・ Omori, T. et al. (1995). Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE III. Quality of collected data files, *Alternative Animal Testing and Experimentation*, 5, 59-73.
- ・ Sugiyama, M., Mori, M., Hoya, M. (2002). A Strategic approach for predicting phototoxicity of cosmetic ingredients, *Alternative Animal Testing and Experimentation*, 9, 29-39.
- ・ Sugiyama, M., Itagaki, H., Kato, S. (1994). In Vitro assays to predict phototoxicity of chemicals: (II) Yeast growth inhibition assay and battery system with photohemolysis assay, *Alternative Animal Testing and Experimentation*, 2, 193-202.
- ・ Sugiyama, M., Itagaki, H., Murakami, N., Kato, S. (1994). In Vitro assays to predict phototoxicity of chemicals: (I) Red blood cell hemolysis assay, *Alternative Animal Testing and Experimentation*, 2, 183-191.

⑬酵母光生育阻害試験測定記録

施設:	本試験・予備試験:	回数:
検体物質コード:		系列:
培養名:		
実験日:	時刻:	
実験者名:		

濃度[mg/ml](6穴プレート)

濃度1	濃度2	濃度3
濃度4	増殖対照	6-MOP

阻止帯の長さ:上記の6穴プレートに対応させて入力してください

照 射	縦:	縦:	縦:
	横:	横:	横:
	縦:	縦:	縦:
	横:	横:	横:
非 照 射	縦:	縦:	縦:
	横:	横:	横:
	縦:	縦:	縦:
	横:	横:	横:

コメント:

入力されたデータはプログラムにより一括処理されます。記入漏れのないようにお願いします。  
シートの改変は行わないでください。  
入力について不明な点は問い合わせにより確認してください。

図1 酵母光生育阻害試験のデータシートファイル

試験は6穴プレートを用いて行われるため、用量と測定値の記入欄は6穴プレートと対応をとるようにしている。一枚のシートで1回の試験の1系列分を記入するようになっている。



⑬赤血球光溶血試験測定記録

施設:  本試験-予備試験:  回数:   
 実施日:  時刻:  系列:   
 実施者名:  吸光度:

物質とその(赤血球990μLを添加する前の)濃度(mg/ml)(24穴プレート)

物質	濃度	物質	濃度	物質	濃度	物質	濃度	物質	濃度	物質	濃度	物質	濃度
物質1		物質1		物質1		物質1		物質1		物質1		物質1	
物質2		物質2		物質2		物質2		物質2		物質2		物質2	
物質3		物質3		物質3		物質3		物質3		物質3		物質3	
物質4		物質4		物質4		物質4		物質4		物質4		物質4	
物質5		物質5		物質5		物質5		物質5		物質5		物質5	
物質6		物質6		物質6		物質6		物質6		物質6		物質6	
物質7		物質7		物質7		物質7		物質7		物質7		物質7	
物質8		物質8		物質8		物質8		物質8		物質8		物質8	
物質9		物質9		物質9		物質9		物質9		物質9		物質9	
物質10		物質10		物質10		物質10		物質10		物質10		物質10	
物質11		物質11		物質11		物質11		物質11		物質11		物質11	
物質12		物質12		物質12		物質12		物質12		物質12		物質12	

吸光度(96穴プレート)、上記の24穴プレートの濃度に対応した吸光度となっているかを確認してください

24穴プレート	1						2					
	a	b	c	d	e	f	a	b	c	d	e	f
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

入力補助欄(左の96穴プレートの入力補助欄です。こちらに入力してください。)

96穴プレート	1						2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a												
b												
c												
d												
e												
f												
g												
h												
i												
j												
k												
l												
m												
n												

コメント:

入力されたデータはプログラムにより一括処理されます。記入漏れのないようにお願いします。  
 シートの盗用は行わないでください。  
 入力について不明な点は問い合わせにより確認してください。

図2 赤血球光溶血試験のデータシートファイル

試験は24穴プレートを用いて行われるため、用量は24穴プレートと対応をとるようにしているが、測定は96穴プレートを用いて行われるため、吸光度の入力は96穴プレートにあわせて作成した。右の欄の入力補助欄は、施設の吸光度計のプリントアウトを入力しやすいように左側と配置を変えている。

表1 提出されたデータファイル数

	予備試験	本試験	合計
酵母光生育阻害試験	76	152	228
赤血球光溶血試験	56	136	192
合計	132	288	420

表2 各データクリーニング項目における問合せ回数と該当データファイル数

I: 問合せ回数、II: 該当ファイル数

問合せ内容の項目	酵母光生育阻害試験		赤血球光溶血試験		合計	
	I	II	I	II	I	II
(1) 何かしらの必要なデータが入力されていない	0	0	1	16	1	16
(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	0	0	1	1	1	1
(3) プロトコールや事前に決められたルールに適合していない	0	0	2	48	2	48
(4) 単純な入力ミス	1	4	2	2	3	6
(5) 試験実施施設からの誤りであると	1	3	0	0	1	3
(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	4	17	10	37	14	54
(7) その他	2	15	7	79	9	94
合計	8	39	23	183	31	222

表3 データクリーニングで問い合わせた内容

試験法	その他の項目	該当ファイル数	主な原因と考えられること
酵母光生育阻害試験	(7-1) 提出された記録用紙からは予備試験か本試験かを確認できない	7	実験者の記入し忘れ
	(7-2) 試験回数番号が「2」と「3」はあるが、「1」がない	8	1回目は試験不成立のため提出しなかったため
	(7-3) 内容の異なる同じ名前のファイルが複数存在する	32	ディレクトリごとを圧縮して送付されたファイルを解凍した際に、ディレクトリが復元されなかったため
	(7-4) 物質がないところに記載された値の内容の確認	8	データシートファイルに1物質、2物質のみが実験された場合のルールを定めなかったため
赤血球光溶血試験	(7-5) その施設には配布されていない物質コードが入力されている	28	データシートファイルに1物質、2物質のみが実験された場合のルールを定めなかったため
	(7-6) 異なるファイルと同じ値が入力されている	1	実験者の提出ミス
	(7-7) 試験回数番号が「5」と「その他」となっており、それ以外がない	8	他の回は試験不成立であり、データシートには最大5回までしか選択できないように設計されていたため
	(7-8) コメント欄の物質名と入力された物質名が異なる	2	実験者の入力ミス

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
戸倉新樹	光線過敏症	玉置邦彦、 塩原哲夫編	皮膚免疫ハンドブック改訂2版	中外医学社	新宿区東京都	2004	215-224
戸倉新樹	光線過敏型薬疹	玉置邦彦編	最新皮膚科学体系	中山書店	文京区東京都	2004	75-82

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
大野泰雄	動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受け入れの現状	国立医薬品食品衛生研究所報告 122	122号	1-10	2004
大野泰雄	日本における動物実験代替法の開発と活動状況	Fragrance Journal	2月号	1-14	2005
Hongo T, Kajikawa M, Ishida S, Ozawa S, Ohno Y, Sawada J, Umezawa A, Ishikawa S, Kobayashi T, and Honda H	Thee-Dimensional High-Density Culture of HepG2 Cells in a 5-ml Radial-flow Bioreactor for Construction of Artificial Liver	J. Bioscience and Bioengineering.	Vol 99, No 3	237-244	2005
K. Toda, S. Ishida, K. Nakata, R. Matsuda, S. Ozawa, J. Sawada, Y. Ohno, K. Inoue, K. Shudo and Y. Hayashi:	Improvement in reliability of probabilistic test of significant differences in GeneChip experiments	Anal. Sci.,	Vol 20	731-733	2004
Kyoko Toda, Seiichi Ishida, Kyoko Nakata, Reiko Matsuda, Yukari Shigemto-Mogami, Shogo Ozawa, Jun-ichi Sawada, Yasuo Ohno, Kazuhide Inoue, Kouichi Shudo, Yuzuru Hayashi	Improvement in reliability of Probabilistic Test of Significant Difference in GeneChip Experiments	Analytical Sciences	Vol 20	731-733	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sugita K, Shimauchi T, Tokura Y	Chronic actinic dermatitis associated with adult T-cell leukemia.	J Am Acad Dermatol	52	S38-40	2005
Orimo H, Mei N, Boiteux S, Tokura Y, Kasai H	Analysis of 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua) released from DNA by the formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) protein: a reliable method to estimate cellular oxidative stress.	J Radia Res	45	455-460	2004
Tokura Y	Skin as an immunologic organ.	Photomed Photobiol	26	3-4	2004
戸倉新樹	薬剤光線過敏症	MB Derma	96	12-19	2004
戸倉新樹	光アレルギーの臨床をどうするか	皮膚アレルギーフロンティア	3	32-40	2005
戸倉新樹	薬剤性光線過敏症におけるランゲルハンス細胞の役割	皮膚の科学	3	455-460	2004
戸倉新樹	光線過敏症における光アレルギーの位置	皮膚アレルギーフロンティア	3	7-10	2005
戸倉新樹	後天性の光線過敏症はなぜ起こる？	日本皮膚科学会誌	114	2027-2029	2004
Kiyomi Ohmori, Kiyoshi Sasaki, Shin Asada, Norihiko Tanaka and Makoto Umeda	An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells	Mutation Res.	557	191-202	2004
田中憲穂	医療用具の製品化を目的とした前臨床試験	バイオマテリアル-生体材料-	22	320-327	2004
田中憲穂	照射食品の遺伝的安全性試験	食品照射	39	13-27	2004
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
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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--18	2004

- 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.
- 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.

# 動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受け入れの現状

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 大野泰雄

Validation and regulatory acceptance of alternative  
methods for toxicity evaluation.

Yasuo Ohno  
Division of Pharmacology, Center for Biological Safety and Research,  
National Institute of Health Sciences

## 動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受け入れの現状

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 大野泰雄

Validation and regulatory acceptance of alternative  
methods for toxicity evaluation.

Yasuo Ohno

Division of Pharmacology, Center for Biological Safety and Research,  
National Institute of Health Sciences

For regulatory acceptance of alternative methods (AMs) to animal toxicity tests, their reproducibility and relevance should be determined by intra- and inter-laboratory validation. Appropriate procedures of the validation and regulatory acceptance of AMs were recommended by OECD in 1996. According to those principles, several *in vitro* methods like skin corrosivity tests and phototoxicity tests were evaluated and accepted by ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods), ICCVAM (The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods), and OECD. Because of the difficulties in conducting inter-laboratory validation and relatively short period remained until EU's ban of animal experiments for safety evaluation of cosmetics, ECVAM and ICCVAM have recently started cooperation in validation and evaluation of AMs. It is also necessary to establish JaCVAM (Japanese Center for the Validation of AM) to contribute the issue and for the evaluation of new toxicity tests originated in Japan.

## 1. 序

動物実験代替法(代替法)とは科学研究や教育、毒性試験、生産等の目的のための動物を用いる方法を動物を用いない方法に置き換えること(Replacement)であり、動物使用数の削減(Reduction)や動物使用に伴う苦痛の削減等(Refinement)を含むものである(Russel and Burch 1959)<sup>1)</sup>。代替法開発はもともと動物愛護の精神に根ざすものであるが、同時に無駄な動物実験の廃止や多数の新規化学物質の安全性の経済的な評価、毒性の極めて強い化学物質の毒性を動物実験で調べることに伴う危険の回避、また、ヒトへの外挿のために必要な毒性発現機序に関する情報の確保のためにも有効である。

代替法の研究は欧米では早くから行われており、イギリスでは医学分野における実験動物を他のものに置き換えるための基金(FRAME)が1969年に、米国では1981年にジョンズホプキンス大学に代替法センターが開設された。日本では1982年に現在の日本動物実験代替法学会の前身となる研究会が設立された。これらの研究を通じて多くの方法が開発された。一方、EU議会は動物愛護運動と動物実験に対する反対運動の高まりに対応して、代替法開発の拠点とし、代替法バリデーションの調整や代替法についてのデータベースを構築・維持するため、また、行政、産業、生物・医学分野の科学者、消費者、および動物愛護運動グループの対話を促進することを目的に1991年に代替法バリデーションセンター(European Center for the Validation of Alternative Methods: ECVAM)を設立した(1994年開所)。米国は毒性試験法の開

発、バリデーション、受入、及び国内及び国際レベルでのハーモナイゼーションに関する問題を連邦政府内で調整するためにNICEATM (NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods)の下にNIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences)を含む14の行政機関及び研究機関によりICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)が1993年に設置した。現在欧米の行政機関においては、新たに開発された動物実験代替法を科学的に評価し、可能なものについては取り入れていこうという作業が行われている。また、内分泌かく乱化学物質検索のような新たな毒性評価の要請やトキシコゲノミクスのような新しい技術も導入されつつある。これらの新試験法を行政試験として、取り入れるための検討も視野に入れている。

本稿では新しい試験法を取り入れる為に必要なバリデーションと評価体制のあり方について述べるとともに、動物実験代替法を巡る国際情勢について述べる。

## 2. 動物実験代替法のバリデーションと代替法を行政的に受け入れるための基準

### 2-1) バリデーションとは

動物を用いる安全性試験の結果はヒトに外挿できるという前提の基で利用されているが、常に、薬物の体内動態や標的臓器の薬物感受性における種差を考慮しなくてはならない。一方、*in vitro* 安全性試験代替法では、ヒト由来の組織



を用いることにより、ヒト特異的な反応を観察することが可能であるが、in vivoにあった時とは細胞の特性が変化していることが多い。また、適用可能な被験物質や得られる情報の範囲に動物実験以上に多くの限界がある。例えば、培養細胞を用いる試験法の多くは揮発性物質や不溶性物質、また、毒性発現に代謝活性化を要する物質などの評価が苦手である。色素は毒性指標の測定を妨害する事がある。また、in vivo法とは異なり、吸収・分布・排泄の過程が欠如している。これらの特徴を認識せずに利用すると大きな過ちを犯す可能性がある。従って、国レベルで、或いは国際的な方法として、新たな代替試験法を取り入れるためには、適正に行われたバリデーションに基づいて、その妥当性と限界が明確に示

される必要がある。

バリデーションのあり方については、Scala (1987)<sup>21</sup>、Frazier (1990)<sup>22</sup>、及びBallら(1999)<sup>23</sup>により提示されている。また、小野(1994)<sup>24</sup>及び大野(1997)<sup>25</sup>により要約されている。バリデーションとは「候補試験法について試験結果の信頼性(reliability)と再現性(reproducibility)とを証明し、それが特定の毒性試験の目的に使用できるだけの確実性(credibility)があることを確認する手順である」とされている。

バリデーションの過程は 1) 施設内バリデーション、2) 多施設バリデーション、3) データベース構築の三段階に分けられる(図1)。

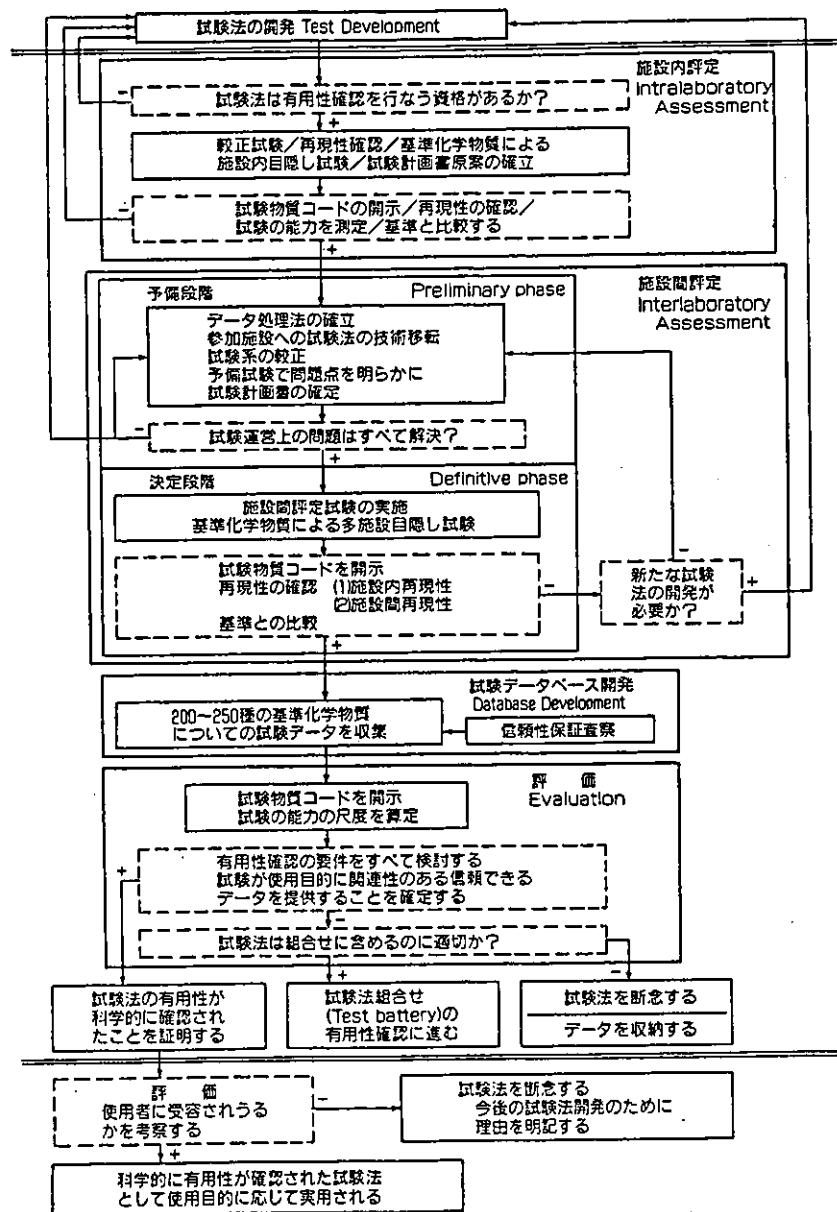


図1:試験法バリデーションの作業過程 (小野 1994)

施設内バリデーションは、通常、当該試験法を開発した施設で行われるものであり、試験法の特徴を明らかにし、次に行われる多施設バリデーションのためのプロトコール、標準操作法、および結果の判定基準を作成する過程である。

多施設バリデーションは同一のプロトコールと標準操作法に従って、複数の施設（3-5施設）で試験を実施した場合の試験法の特徴、つまり感度、特異性、予知能力および施設内・外の再現性を確認する過程である。バリデーションにおいては試験結果の信頼性を高めるために被験物質名とその毒性を明らかにせず、目隠し試験でおこなうとともに、GLP基準に従って実施することが望ましい。

バリデーションに際しては、1) 試験の目的、2) 試験法の選定、3) 被験物質の選定、4) 比較基準とするデータの特定、5) 結果の判定方法とその基準(Prediction Model, Data Interpretation Procedure)が明確に設定されていることが必要である。一方、施設内および多施設バリデーションは必ずしも一回のみで終了するわけではなく、それを繰り返すことにより、プロトコールやSOPの最適化や判定基準の見直しが行われることが多い。原則として、最終段階の多施設バリデーションでは判定基準の妥当性が確認されねばならない。この過程で、検討した被験物質数が増加し、広い範囲の被験物質への適用性を判断するための資料が得られる。

通常、被験物質数は施設内バリデーションにおいては10-20物質、施設間バリデーションでは20-40物質で実施されるが、行政的に利用できるか否かを判定するには不十分とされており、更に文献調査等に基づき200-250物質のデータが必要とされている(Frazier 1992)。

## 2-2) バリデーションの実行

多施設バリデーションは多くの者が参加する複雑な過程であることから、適切な組織を構築し、適正かつ能率良く運営されねばならない。また、多大な時間と経費のかかる過程であることから、施設内バリデーションの結果を詳細に検討・評価し、適切と予想された試験法についてのみ実施されるべきものである。

多施設バリデーションにおいては、参加者間のコミュニケーションを密にし、トラブルを未然に防止あるいは早期に発見し、対策を講じることが、ボランティアで参加している協力者たちの志気の維持と質の高いデータを得るために極めて重要である。

一方、バリデーションに技術的に劣る施設が参加していると、試験法の performance が不当に低く評価される可能性がある。そこで、参加者の技術レベル向上の為の技術移転と予備試験が欠かせない。これはプロトコールやSOPを参加者が正確に理解し、実行しているか、また、それらに不備が無いかを確認するために必須である。実際に多施設バリデーションを行っている、同じプロトコールとSOPを用いているにも関わらず、施設により実験操作に思いがけない差が

あることに驚く事がある。この多施設バリデーションにより、試験施設を評価し、次に行われる多施設バリデーションの参加施設を選択することが適当である。

被験物質は代替しようとしている既存の試験法における作用についての信頼性の高い情報があり、かつ、試験法の performance を適切に示しうる物でなくてはならない。また、品質が均一で化学的に安定なものが望ましい。毒性を段階的に評価する試験においては、それぞれの段階に適切な数の被験物質が配分されなければならない。毒性の有無のみを判定する試験においては、明確に有無を判定できると予想される物質だけでなく、境界領域の物質も適切な数配分されなければならない。また、試験の使用目的に応じて適切な種類の物質群を選択されねばならない。信頼できるデータを得るためには、被験物質は試験実施施設とは別の施設によりコード化され、配布されねばならない。

多施設バリデーションの実行組織の一例を図2に示した<sup>7)</sup>。これは日本化粧品工業連合会とともに化粧品原料の眼刺激性を評価するための9種のドレイズ眼刺激性試験代替法(16プロトコール)を検討した時の組織であり、バリデーション全体を運営する運営委員会とバリデーションの実行組織である実行委員会、被験物質を選択・管理し、コード化して配布する被験物質管理委員会、及び得られた結果と比較するための in vivo 試験を計画・実施する in vivo 試験委託担当委員会が組織された。個々の代替法に経験の深い者が試験責任者となり、当該代替法のプロトコールとSOP案を作成するとともに、参加機関に技術指導を行った。また、試験責任者と参加機関の代表はバリデーション実行委員会の一員となって連絡・調整を密にした。

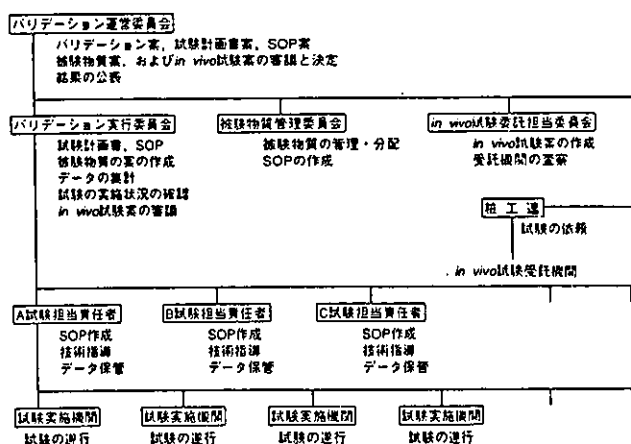


図2：バリデーション組織

## 2-3) 簡便なバリデーション法

新しい試験法が既に承認された代替法と同一の原理に基づくものであり、変更内容がminorな場合においては、少数の被験物質によるバリデーション(catch up validation)により評価することが可能である。



している。

表 2：安全性評価のための動物実験代替法の最低基準の要約 (OECD 1996)<sup>10)</sup>

- 1) 試験法の適切性に関する情報がある (科学的な必要性, 行政的目的を含む)
- 2) 測定される指標と in vivo での作用との関係や毒性との関係について記述されている。代謝能のような試験法の限界について記述されている。
- 3) 正式かつ詳細なプロトコルがあり, 一般のものが入手可能である。プロトコルは試験が正確に実施できるように詳細に記述されている。また, データの分析法や意志決定基準が示されている。
- 4) 試験法とその結果は独立した査読された出版物として得られることが望ましい。結果は独立した科学者により査読されることが望ましい。
- 5) 試験施設内外における反復性や再現性が示されている。
- 6) コード化された被験物質を用いて試験法の performance が示されている。
- 7) 既存の毒性試験結果と対応する標的動物種からの情報との関係において試験法の performance が示されている。
- 8) 試験法の妥当性を評価するため全データが査読可能である。
- 9) 理想的にはデータは GLP principle に則って得られたものである。

表 3：安全性評価のための動物実験代替法の行政的受け入れ基準の要約 (OECD 1996)<sup>10)</sup>

- 1) 関心のある毒性指標を十分に predict できるデータが提示されている。また, 新しい方法と既存の方法との間の関係や, 新しい方法と標的動物種との関係について示されている。
- 2) リスクアセスメントの目的のために, 既存の方法と比較し同等以上, 望むらくはそれ以上の価値を有するデータが得られる。
- 3) 行政的に取り扱われる化学物質や製品の代表例についての十分なデータがある。
- 4) 試験法は堅牢なものであり, 移転可能である。高度に特異化された機器や物質, 専門的知識が必要な場合は, 移転性を高める努力がなされている。
- 5) 経済的であり, 使用される可能性が高い。
- 6) 既存の方法と比較し, 科学的, 倫理的, 経済的である。

### 3. 動物実験代替法を巡る国際状況

#### 3-1) EUにおける代替法の検討と受け入れ状況

ECVAMの諮問委員会であるESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)は1997年には3T3 NRU 光毒性試験, 1998年には皮膚腐食性試験としてEPISKIN™とラット Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER 法), 2000年には皮膚感作性のためのLocal Lymph Node Assay (LLNA), EpiDerm™皮膚腐食性試験, CORROSITEX™皮膚腐食性試験, 2002年には胎児毒性のための胚性幹細胞試験, 胎児毒性のための全胚培養試験, 胎児毒性のためのマイクロマス試験を確立された代替試験法として承認した。このESACの結論を受けてEUはこれらの代替試験から得られたデータを化粧品安全性評価に用いることに合意した。EUの化粧品および非食品に関する健康および消費者保護担当機関であるSCCNFP (Scientific Committee for Cosmetic Products, and Non-food Products intended for Consumers)は光毒性試験試験(3T3 NRU PT法)および皮膚腐食性試験(TER, EPISKIN™, EpiDerm™法)を公的に validation された試験法として認めた。また, 経皮吸収試験(ヒトあるいはブタ皮膚を用いる in vitro Skin Absorption 法)および皮膚感作性試験(LLNA 法)を認めた<sup>11)</sup> (2002.6.4)。なお, LLNA法はモルモットのMaximization法を完全に代替するものではない。一方, フランスは眼刺激性試験法としてアガロースゲル拡散細胞毒性試験法とウサギ角膜繊維芽細胞法(NR)を公示した(1999.12.30)。

一方, EUでは1993年の時点で化粧品の安全性評価に関する指令<sup>12)</sup>において, 適切な代替法があればとの前提つきではあるが, 1998年までには実験動物を用いて安全性を評価した化粧品原料および最終製品の販売を禁止することを決めた。しかし, 代替法の開発・バリデーションが充分でなかったことから, その施行を2000年6月30日まで延期した。その後, 2002年6月末まで再度延期された。その再再延長に関する調停会議での合意結果を踏まえ, 化粧品およびその原料の安全性評価に関する化粧品指令第7次改正がEU政府及び議会で認められ, 2003年3月11日付けで公布された<sup>13)</sup>。その内容は①ECVAMやOECDで承認された代替法があるものはすべて即時禁止, ②2009年までに動物を用いる全ての安全性試験を全面的に禁止, 及び動物実験を行った化粧品の販売禁止, 但し, ③薬物動態試験や生殖発生毒性, 反復投与毒性試験などの全身的な作用を検討する試験については2013年まで猶予する, というものである。

この後の動きとして, フランス政府および欧州化粧品原料連合会 (European Federation for Cosmetic Ingredients) は, 第7次改正の該当規制が不明瞭で, 加盟国批准の際に実施される自国法規制への取り込みは解釈の異なったものとなり, 通商上の混乱を引き起こすとして, EU議会およびEU理事会を提訴した<sup>14)</sup>。現在, この提訴に対する判決はまだなされていない。また, EU委員会は2004年9月11日までに具体的な試験禁止に向けた活動計画を策定するため, 行政, 学