

- ロモーターの検出、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 梅田誠、佐々木澄志、田中憲穂、：発ガン性試験の代替法：ECVAMでPrevalidation Studyの現状、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 大森清美、梅田誠、田中憲穂、高木弘毅、吉村功、佐々木澄志、浅田晋、酒井綾子、浅倉真澄、馬場博、伏脇裕一、浜田修一、鬼頭暢子、中村哲、中村好志、大石英俊、佐々木聡、嶋田佐和子、土屋敏行、宇野芳文、鷲塚昌隆、矢嶋聡、山下康人、山村英二、八城友子：発ガン性プロモーター検出のためのBhas 42細胞を用いた細胞形質転換試験に関する共同研究結果について、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 中川ゆづき、田中憲穂、：ラットFRSK細胞を用いたin vitro小核試験法、日本動物実験代替法学会、2005年12月伊勢原
- 和田昌憲、本郷有克、若栗忍、石川陽一、梅田誠、田中憲穂：培地中グルコースの消費を指標とする毒性評価法の応用、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 山影康次、高橋俊孝、浅田晋、田中憲穂：In vitro光染色体異常試験における各種照射条件とその影響、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 北垣雅人、若栗忍、田中憲穂、板垣宏：急性毒性試験代替法の検討（3）：2施設間におけるCollagen Gel Assayを用いた急性毒性試験予測性の評価、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- 若栗忍、大野泰雄、田中憲穂：細胞毒性によるin vivo全身毒性の予測について-代謝活性化の導入および処理条件の検討-、日本動物実験代替法学会、2005年12月、伊勢原
- Noriho Tanaka: The Activity of JSAAE -past, present and future, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005
- Isao Yoshimura, Takashi Omori, Yasuo Ohno, Masatoshi Hoya, Masaki Mori, Takaaki Doi, Yuriko Fujita, Hiroshi Itagaki, Rumi Kawabata, Hajime Kojima, Seiji Hasegawa, Yuko Okamoto, Noriho Tanaka, Kouko Tanigawa and Shinobu Wakuri: Validation study on the battery system for prediction of phototoxicity in Japan: The overview of the results, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005.
- Shinobu Wakuri, Yutaka Matsumoto, Makoto Hayashi and Noriho Tanaka: Application of in vitro alternative methods to ecotoxicology, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005
- Kiyomi Omori, Makoto Umeda, Noriho Tanaka, Hiroki Takagi, Isao Yoshimura, Kiyoshi Sasaki, Ayako Sakai, Harumi Araki, Masumori Asakura, Hiroshi Baba, Yuichi Fushiwaki, Shuichi Hamada, Nobuko Kitou, Tetsu Nakamura Yoshiyuki Nakamura, Hidetoshi Oishi, Satoshi Sasaki, Sawako Shimada, Toshiyuki Tsuchiya, Yoshifumi Uno, Masataka Washizuka, Satoshi Yajima, Yasuhito Yamamoto, Eiji Yamamura and Tomoko Yatsushiro: Inter-laboratory collaborative study of cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells by non-genotoxic carcinogen study group in Japan, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005.
- Makoto Umeda, Noriho Tanaka, Shin Asada, Kiyoshi Sasaki and Kumiko Hayashi: Detection of non-genotoxic carcinogens using ras-transfected Bhas 42 cells, 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August, Berlin (Germany) 2005
- Noriho Tanaka: Current activities of alternative research in Japan, 1st International Forum on Laboratory Animal Science and Technology, Beijing (China), November 2006

Table 1 Chemical list

Cytotoxicities	Chemicals
S9+ = S9-	2-ethylanthraquinone Thiourea dioxide
S9+ > S9-	3-Aminophenol 2,4-Di-tert-butylphenol 3-ethylphenol 3-methylphenol N-ethylaniline
S9- > S9+	4-Aminophenol 6-tert-Butyl-m-cresol Di-n-butyl adipate 2-ethylhexyl methacrylate N-phenylmaleimide
S9- > S9+ (CHL cells)	2,2'-methylenebis (6-tert-butyl-p-cresol) 4,4'-Thiobis (6-tert-butyl-m-cresol) Triisobutylene 2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate

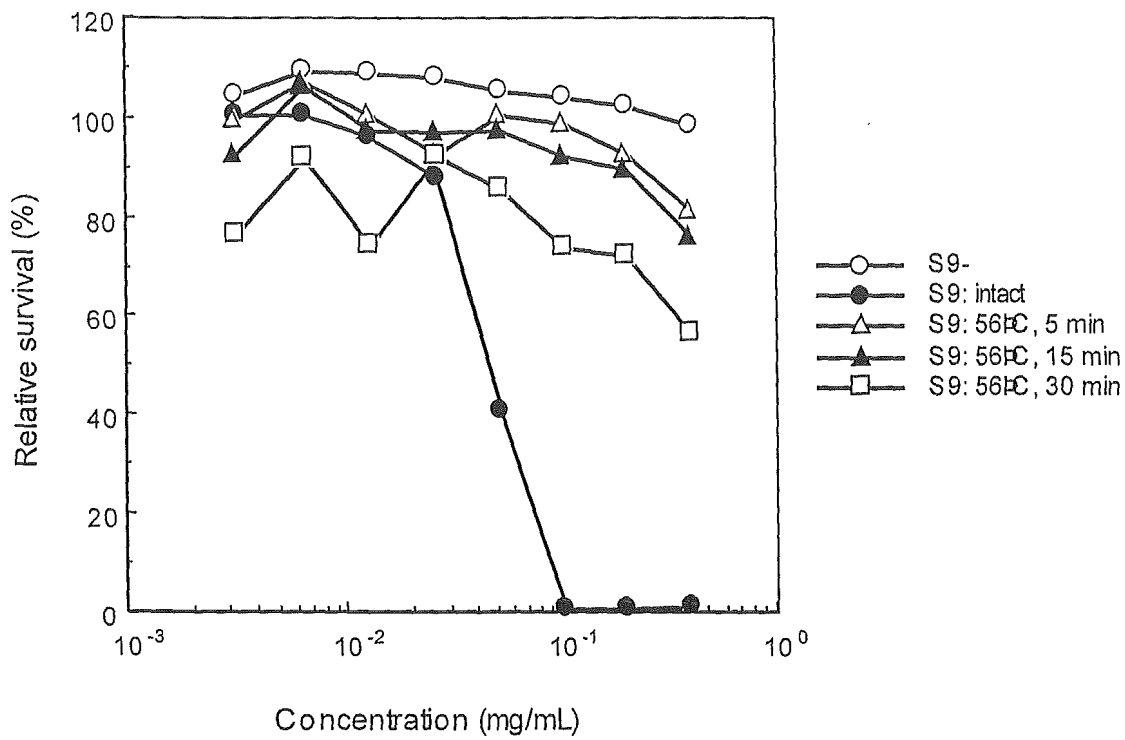


Fig. 1 Cytotoxicities of Cyclophosphamide with various inactivation conditions of S9

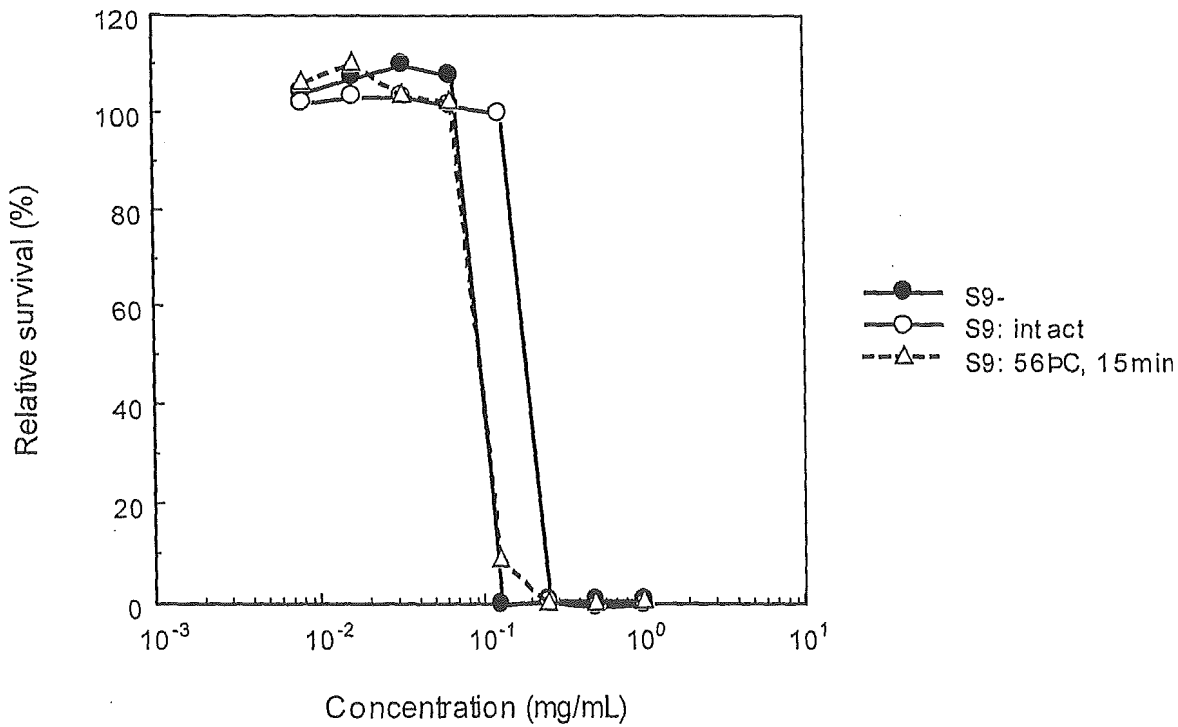


Fig. 2 Cytotoxicities of SDS with or without S9

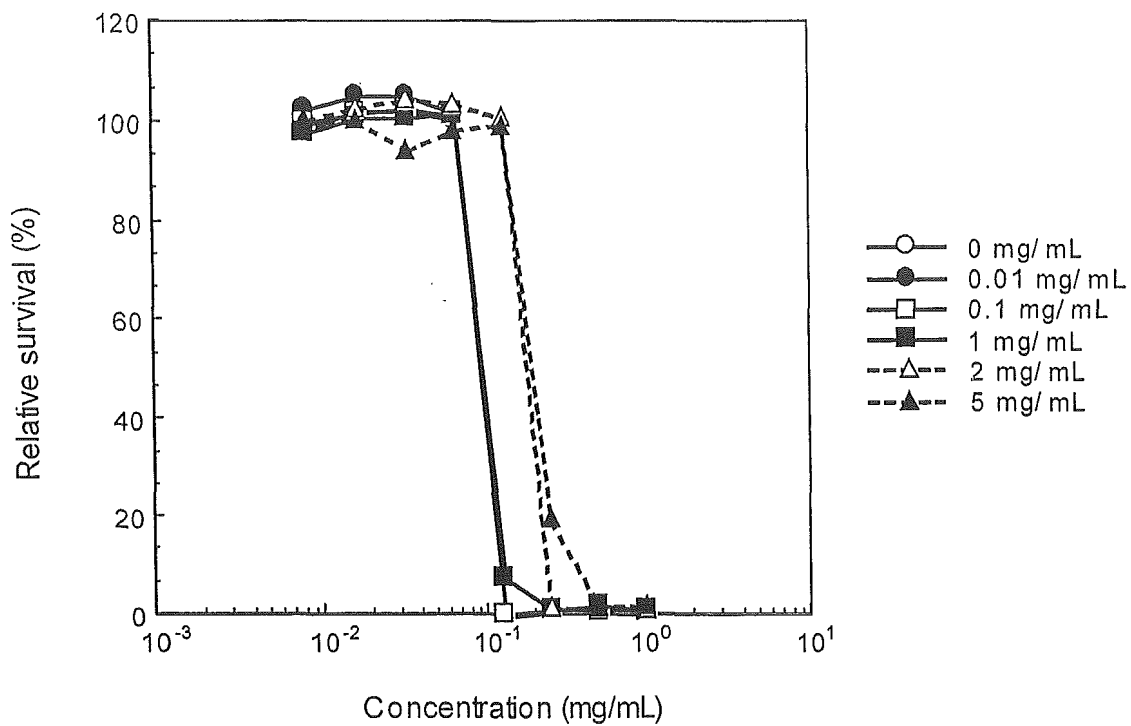


Fig. 3 Cytotoxicities of SDS with various bovine albumine concentrations

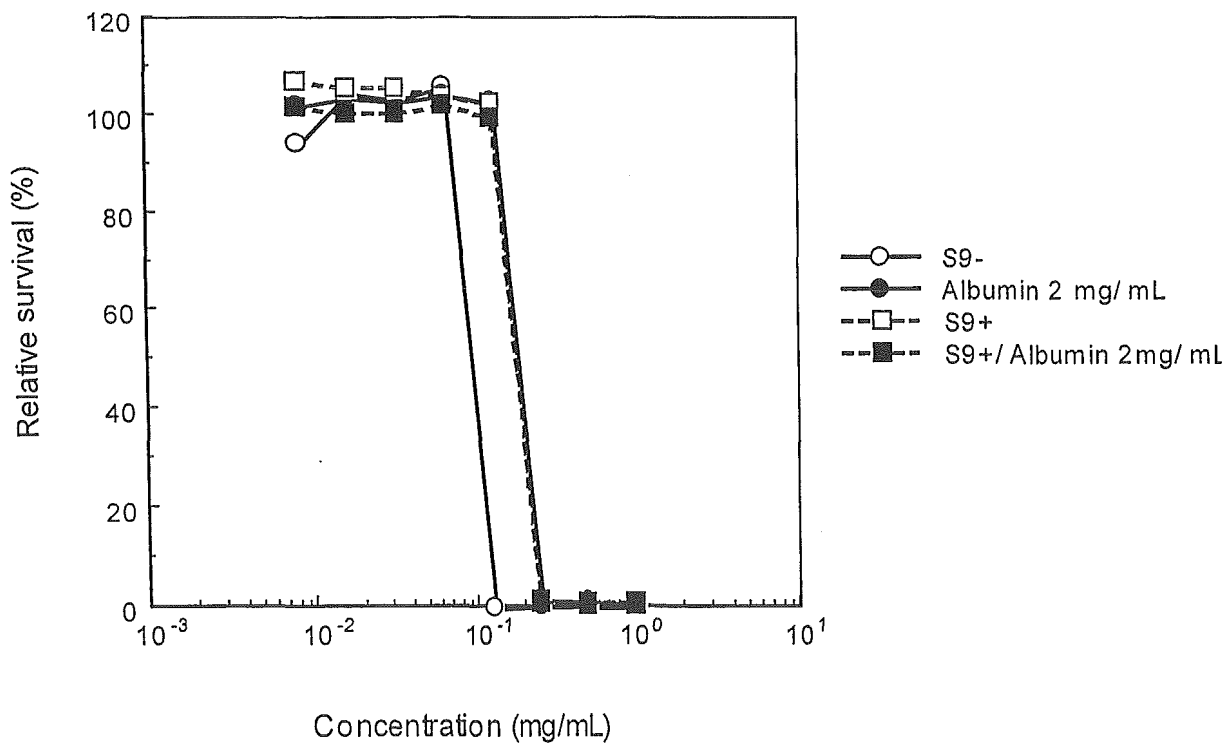


Fig. 4 Cytotoxicities of SDS with or without bovine albumine and/or S9

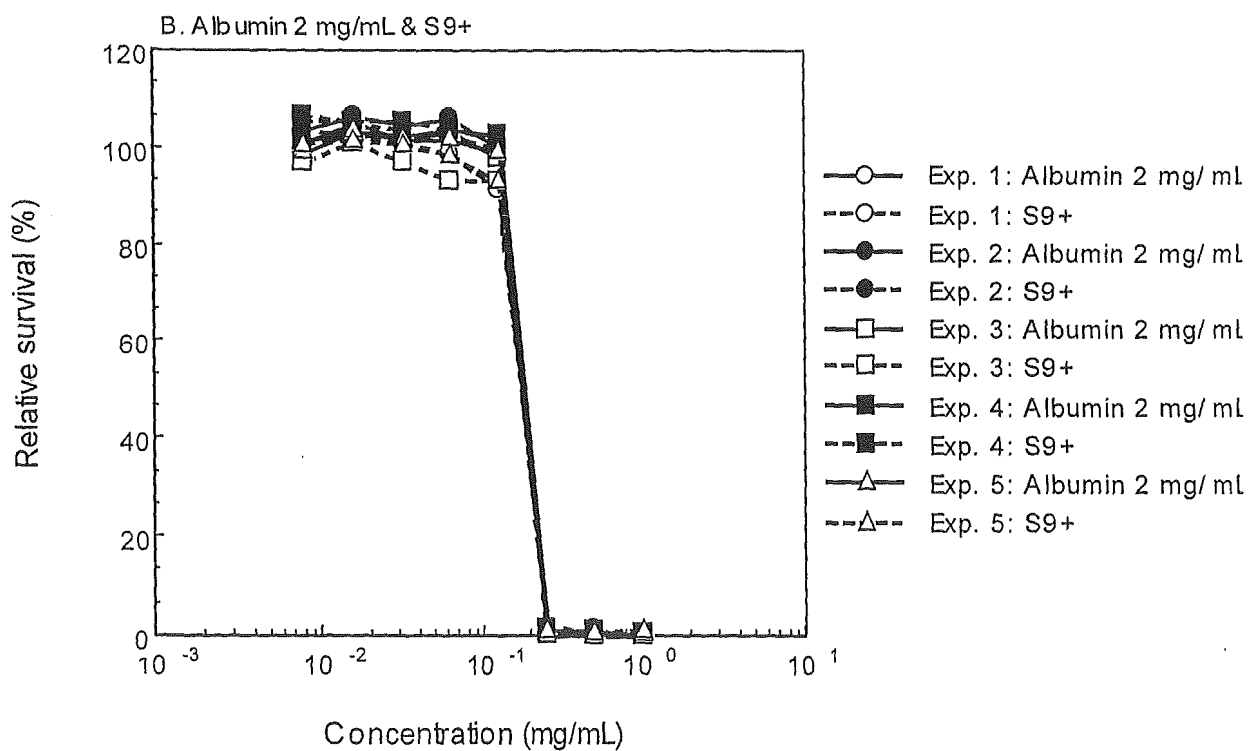
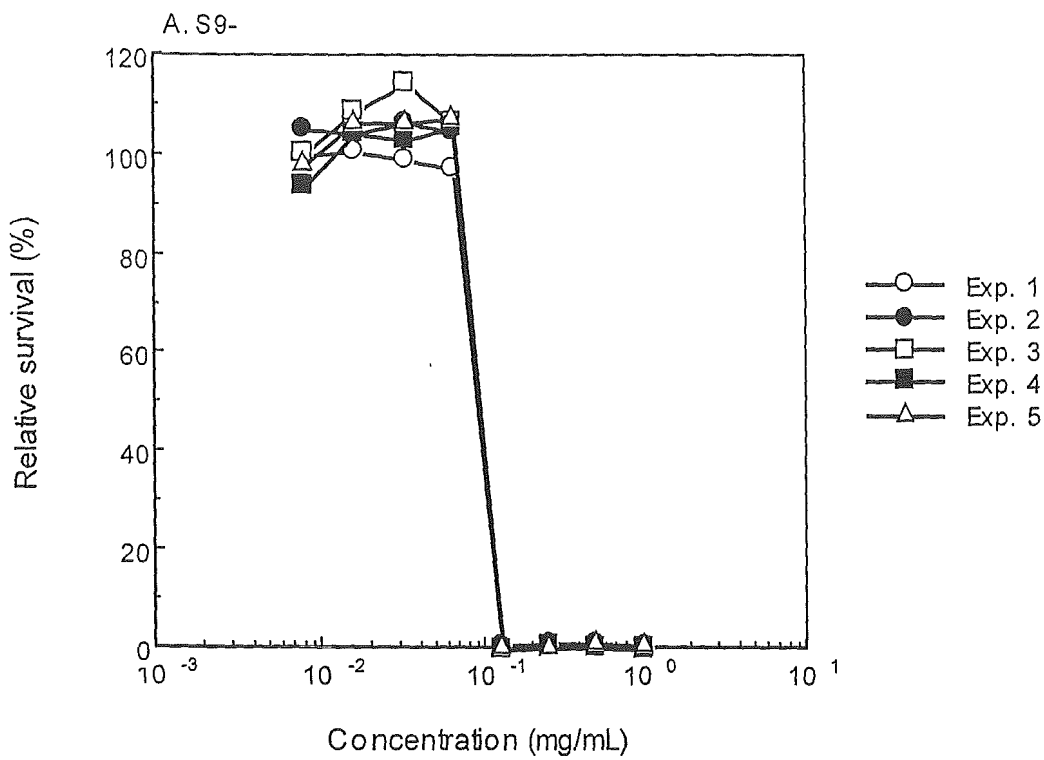


Fig. 5 Cytotoxicities of SDS with or without bovine albumine and/or S9 in 5 Exp.

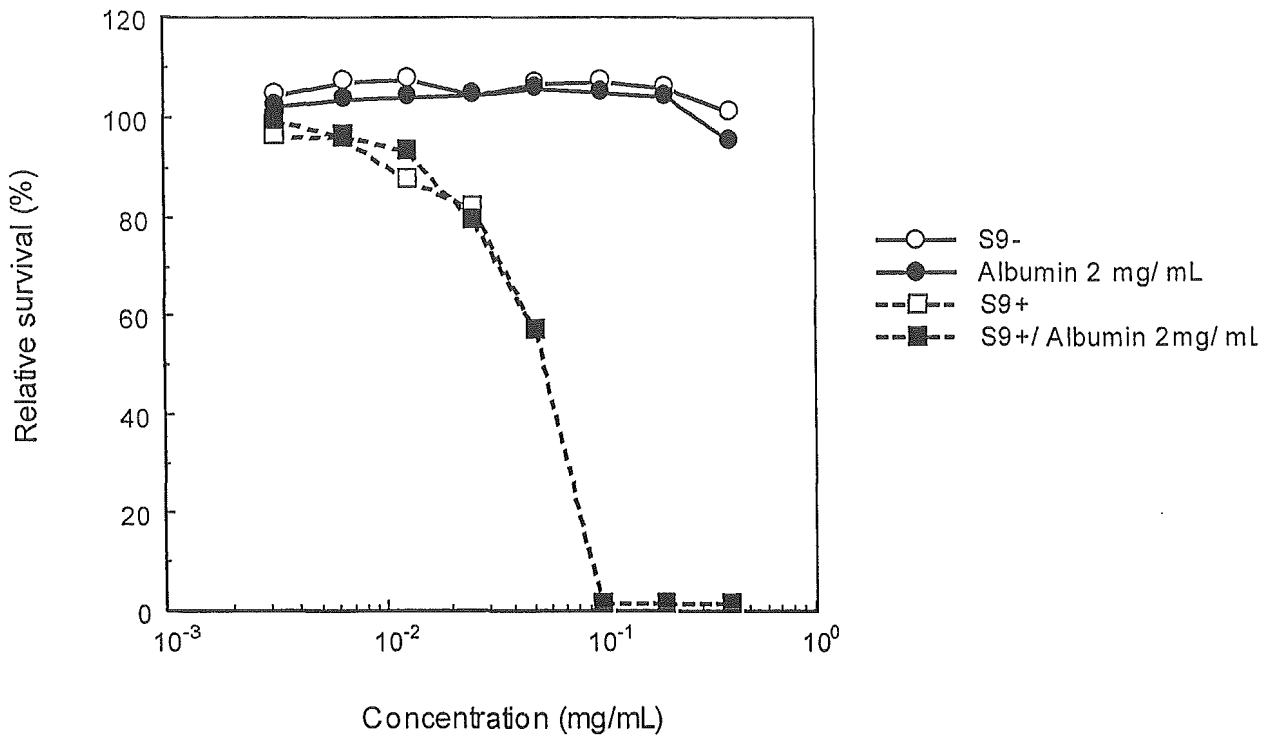


Fig. 6 Cytotoxicities of CP with or without bovine albumine and/or S9

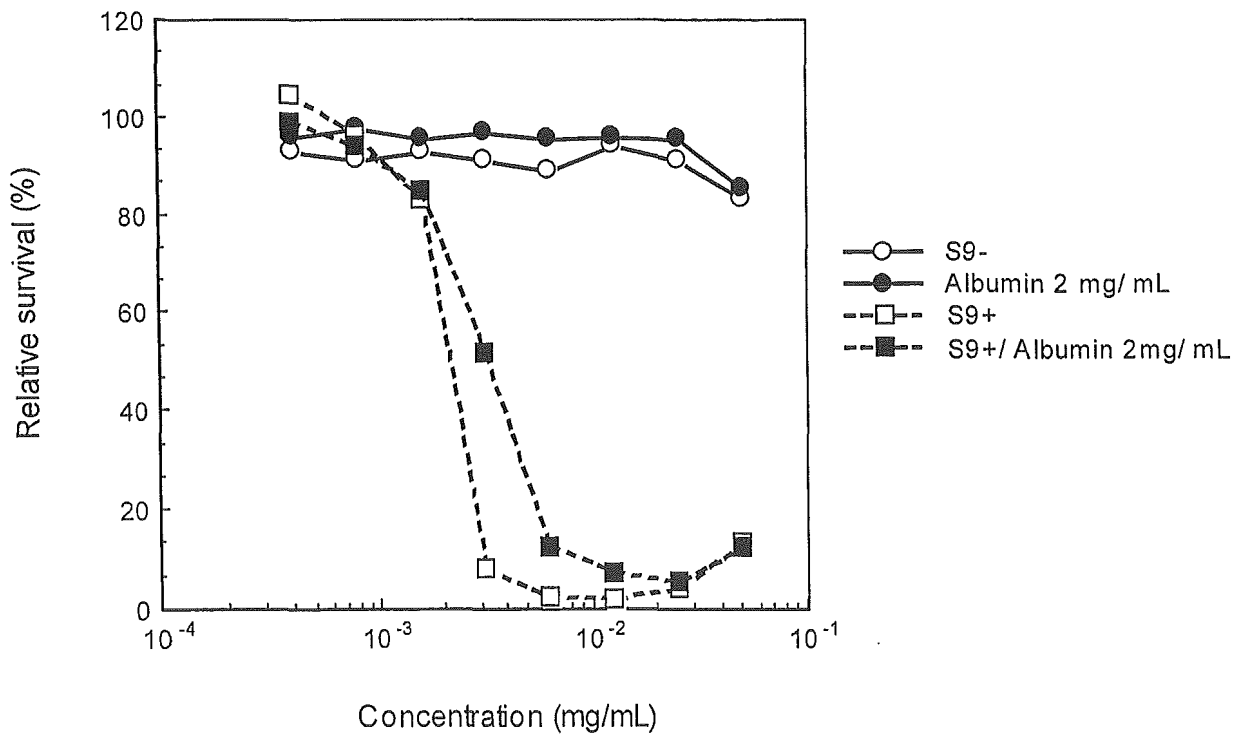


Fig. 7 Cytotoxicities of BaP with or without bovine albumine and/or S9

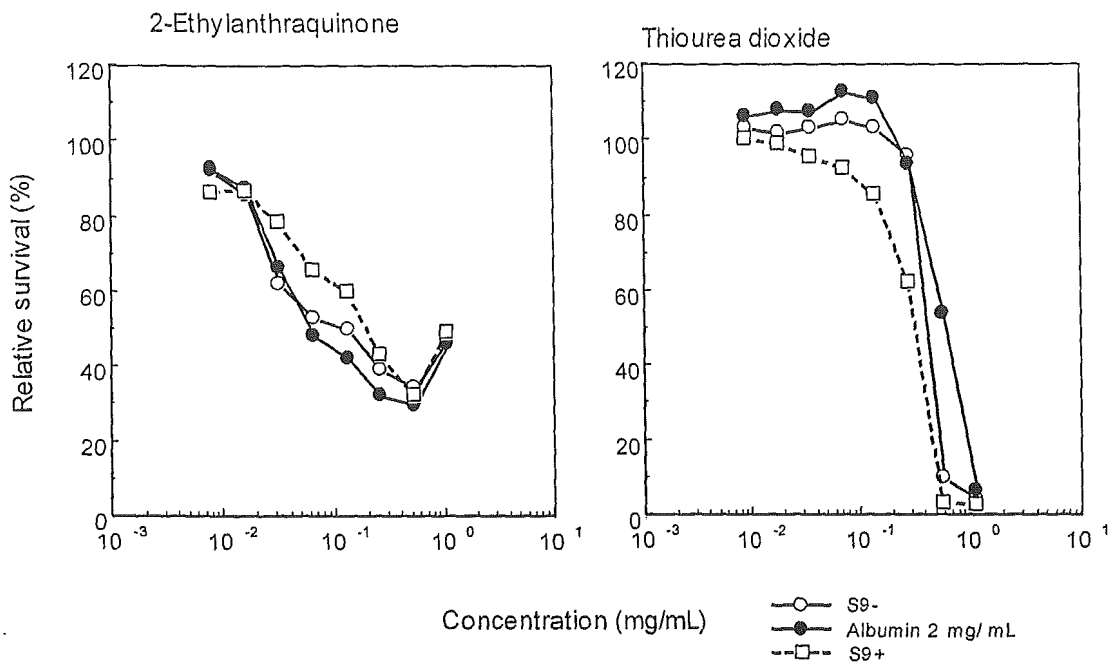


Fig. 8 Results of cytotoxicity tests (tox: S9- = S9+)

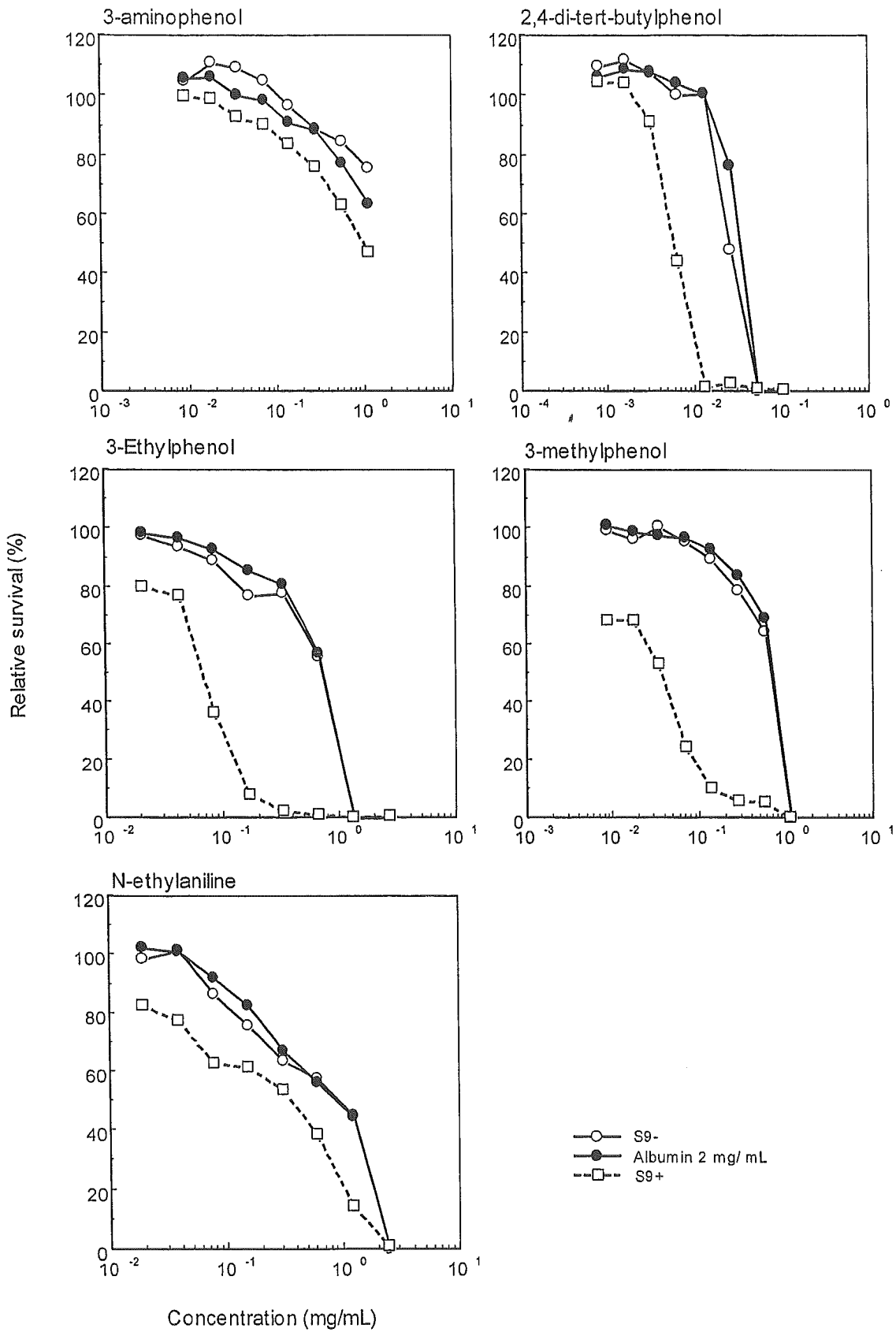


Fig. 9 Results of cytotoxicity tests (tox: S9+ > S9-)

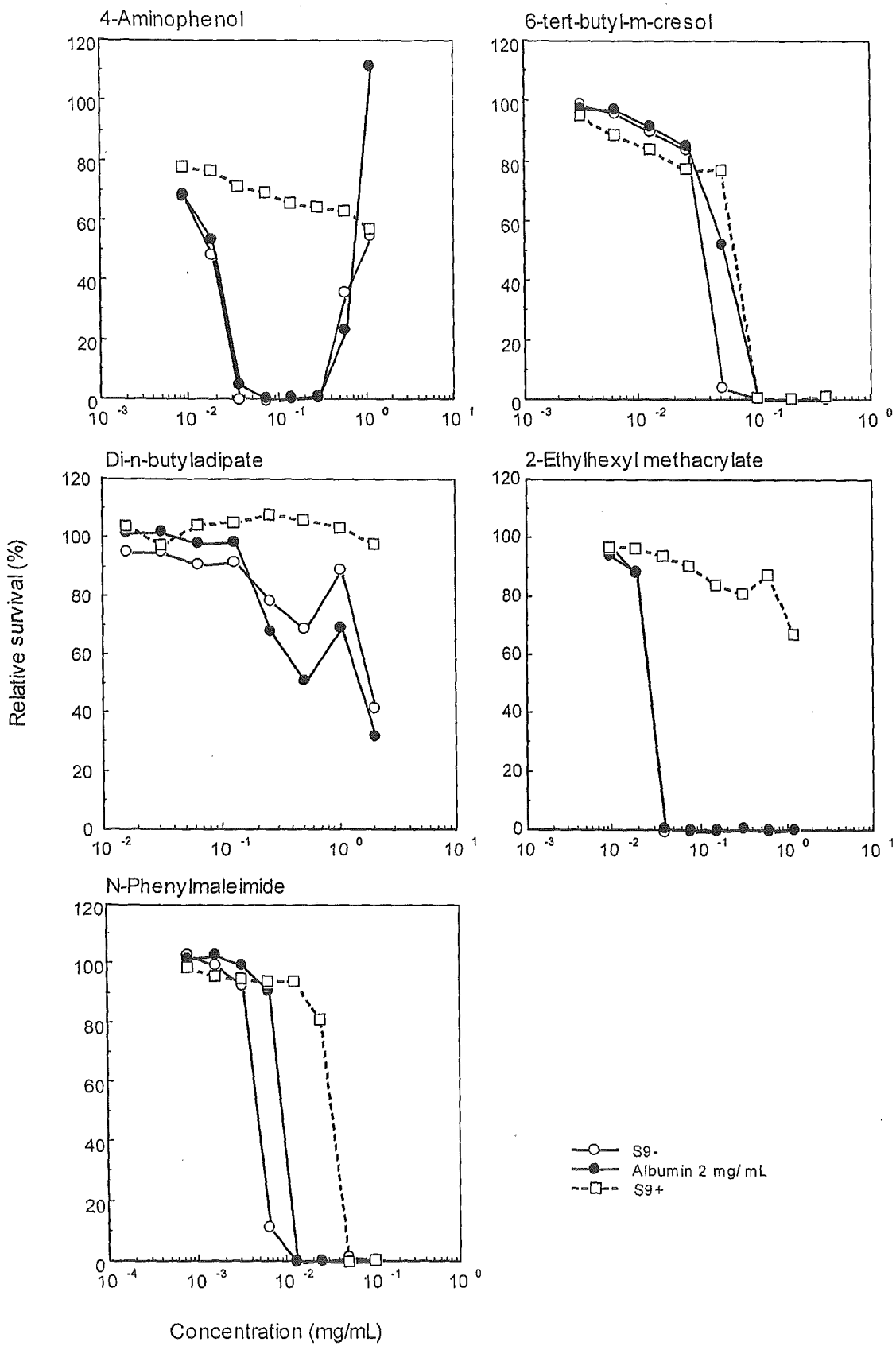


Fig. 10 Results of cytotoxicity tests (tox: S9- > S9+)

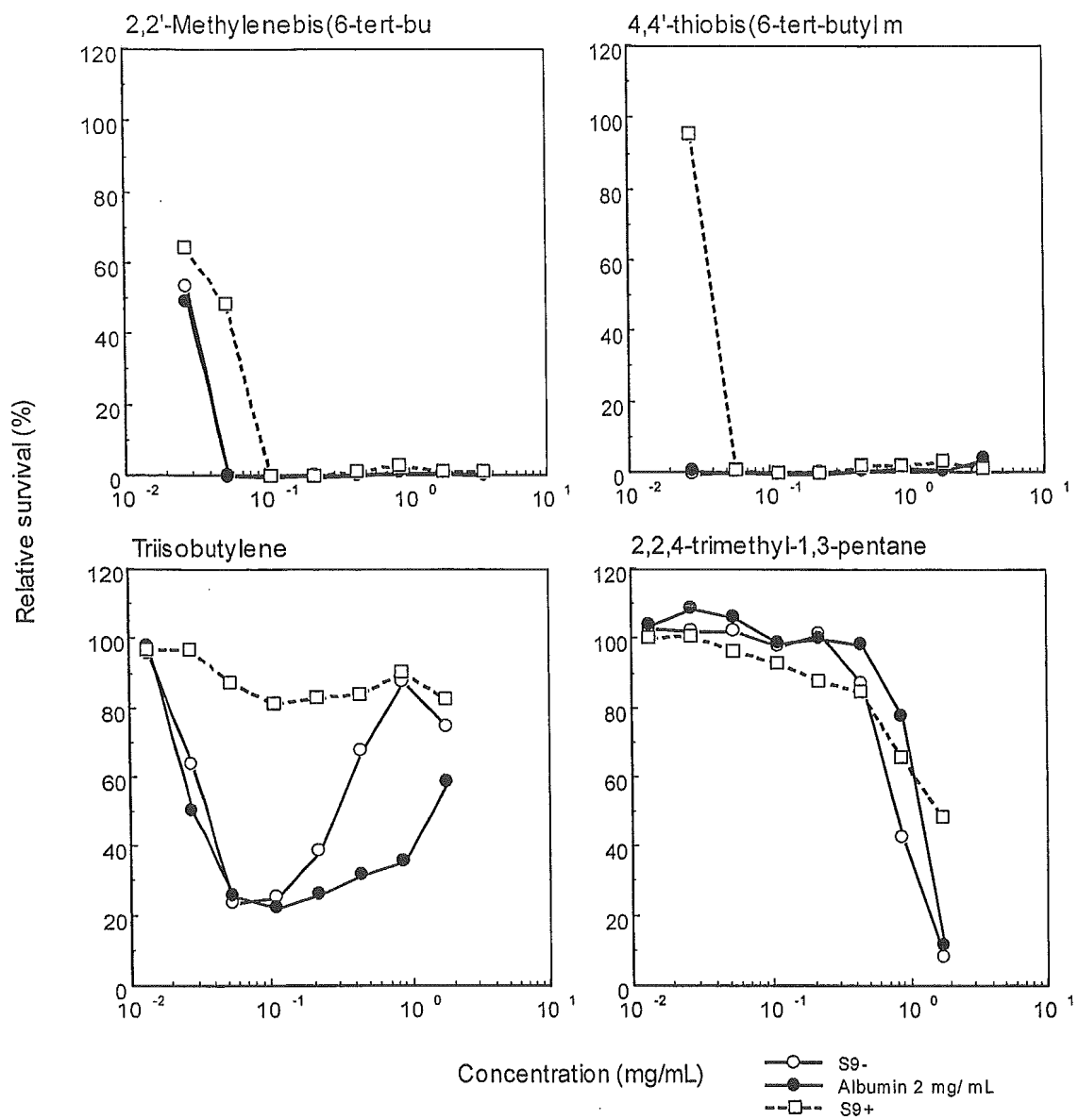


Fig. 11 Results of cytotoxicity tests
 (tox: S9+ > S9- on CHL cells)

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
該当なし							

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
Ryo Kurihara, Fujio Shiraishi, Noriho Tanaka, Shina Hashimoto	Presence and estrogenicity of anthracene derivatives in coastal Japanese waters	Environmental Toxicology and Chemistry	24	1984-1993	2005
Agneta Posengr, Linda Faxius, Noriho Tanaka, Mika Watanabe, Lars Magnus Bjursten	Comparison of implantation and cytotoxicity testing for initial toxic biomaterials	Journal of Biomedical Materials Research	75A Issue 1	115-122	2005
Shin Asada, Kiyoshi Sasaki, <u>Norihito Tanaka</u> , Ken Takeda, Makoto Hayashi and Makoto Umeda	Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 Cells (Bhas 42 Cells)	Mutation Research	588	7-12	2005

<p>Kiyomi Ohmori, Makoto Umeda, <u>Noriho Tanaka</u>, Hiroki Takagi, Isao Yoshimura, Kiyoshi Sasaki, Sh in Asada, Ayako Sakai, Harumi Ara ki, Masumi Asaku ra, Hiroshi Baba, Youichi Fushiwaki, Shuichi Hamada, Nobuyui Kitou, Te tsuo Nakamura, Y oshiyuki Nakamur a, Hidetoshi Oishi, Satoshi Sasaki, S awako Ahimada, T oshiyuki Tsuchiya, Yoshifumi Uno, Masataka Washizu ka, Satoshi Yajim a, Yasuhito Yama moto, Eiji Yamaur a and Tomoko Ya tsushiro: An inter-l aboratory collabora tive study by the Non-Genotoxic Car cinogen Study Gro up in Japan, on A TLA 33, 619-639 (2005) Ryo Kurihara, Fuji o Shiraishi, <u>Noriho Tanaka</u>, Shinya Hashimoto</p>	<p>An inter-laboratory colla borative study by the No n-Genotoxic Carcinogen Study Group in Japan, o n a cell transformation a ssay for tumour promote rs using Bhas 42 cells</p>	<p>ATLA</p>	<p>33</p>	<p>619-639</p>	<p>2005</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------	-----------	----------------	-------------

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
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

代謝活性化能を含む細胞の開発

分担研究者 小澤正吾（国立医薬品食品衛生研究所、薬理部）

研究要旨

ヒト皮膚に発現が認められる CYP1A1 に機能が類似している CYP1A2 が組み込まれた細胞系や CYP1A2+NAT2 が組み込まれたチャイニーズハムスター細胞（CHO）系を用いて生体外異物を被験物質として代謝活性化による細胞増殖抑制作用を指標にして検討した。また、これら細胞の細胞増殖抑制作用を指標に被験物質を予め皮膚に存在することが知られている CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A5 を発現しているミクロソームとインキュベートした後に、上記 CHO 細胞に暴露することにより活性化による細胞増殖抑制作用の亢進が起こるかどうかを検討した。

A. 研究目的

皮膚腐食性試験や皮膚感作性試験の *in vitro* 代替法は皮膚ケラチノサイト、皮膚三次元モデル、ヒト免疫系細胞を用いて開発が行なわれている。これらの系で大きな問題点の一つは、皮膚のいわゆる薬物代謝酵素による代謝活性化経路が組み込まれていないため、皮膚に対する有害事象の発現に代謝活性化を要する場合は、*in vitro* 代替法試験を用いると *false negative* になる可能性がある被験物質があることである。本研究では、ヒトケラチノサイト等を用いて開発中の皮膚腐食性や皮膚感作性試験の *in vitro* 代替法に、薬物代謝酵素による代謝活性化能を組み込んだ系の開発の基盤的研究を遂行することを目的とする。

B. 研究方法

B-1) 種々の生体外異物の細胞増殖抑

制作用を見やすい細胞系としてチャイニーズハムスター卵巣細胞を 3 種類用いた。すなわち、代謝活性化系なし(CHO)、シトクロム P450 1A2 (CYP1A2) による代謝活性化系のみ (CHO/1A2)、および CYP1A2+アリルアミンN-アセチル転移酵素 NAT2 を代謝活性化系として有している (CHO/1A2+NAT2) 細胞の増殖抑制作用を指標にして、これら細胞内に組み込まれた代謝活性化系の働きを *m*-aminophenol, vanillin を被験物質とした。これら 2 物質を 6000 細胞/well の細胞数で 96 穴プレートに播種し、被験物質濃度としては 0.5 mM, 0.17 mM, 0.06 mM, 0.02 mM として、増殖抑制作用を代謝活性化系を有する細胞と有しない細胞間で比較した。なお細胞の増殖抑制作用は被験物質を 4 日間 37°C で作用させた後、細胞を 0.4 %クリスタルバイオレット・50%エタノール溶液で固定・染色する

ことにより算定した。

B-2) 予めヒト皮膚に存在することが知られている CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A5 発現細胞由来ミクロソーム (GENTEST) と上記 2 種の被験物質を濃度 0.5 mM, 0.17 mM, 0.06 mM, 0.02 mM とし、37°C、1 時間プレインキュベートして代謝活性化させた後に前項の 3 種の CHO 細胞を用いて CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A5 による代謝活性化を通じて細胞増殖抑制作用が亢進するかどうかを調べた。なお、CYP 発現細胞由来ミクロソームの対照として、CYP を発現していないミクロソームを用いた。また、加えた CYP は 1 nmole に統一し、代謝活性化反応に電子伝達系として 1 mM NADPH を加えた。

C. 研究結果

C-1) CHO 細胞内在性の CYP1A2、NAT2 による被験物質の細胞増殖抑制作用の亢進

前記濃度の *m*-Aminophenol, Vanillin を被験物質にして各種 CHO 細胞による増殖抑制作用を検討したところ、いずれの物質による代謝活性化系を有しない CHO 細胞、CHO/1A2 および CHO/1A2+NAT2 に対して最高濃度 0.5 mM でも細胞増殖抑制作用は認められなかった。従って、これら 2 物質は 0.5 mM でも細胞増殖を抑制せず、また、CYP1A2 や CYP1A2+NAT2 による代謝活性化で細胞増殖抑制作用を有する活性体に変換され、細胞増殖抑制を示すという当初の作業仮説も成立しなかった。*m*-Aminophenol は芳香族一級アミンなので、癌原性アリルアミンでよく認められる CYP1A2 により N-水酸

化を受け、NAT2 による究極活性化体への変換により細胞毒性を示すという過程を想定したが、それを反映した細胞毒性は認められなかった。

C-2) CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A5 と被験物質をプレインキュベートした後細胞に作用させることによる細胞増殖抑制作用の検討

m-Aminophenol を CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A5 とプレインキュベートした後、CHO, CHO/1A2, CHO/1A2+NAT2 の培養系に加えることで細胞増殖抑制作用が基質濃度依存的、また、CYP を含有しないミクロソームと比較して細胞増殖抑制が亢進しているかどうかを検討した結果、上記 CYP 中で、CYP2E1 が 0.5 mM の *m*-Aminophenol 存在下で約 50% の細胞増殖抑制作用が CYP を含まないミクロソームと比較して 3 種の細胞いずれでも認められた。これに対し、Vanillin ではいずれの CYP でも細胞増殖抑制の亢進は認められなかった。

D. 考察

今回、ヒト皮膚に発現が認められると考えられるシトクロム P450 分子種、CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A5 による代謝活性化をチャイニーズハムスター卵巣由来細胞の増殖抑制作用の亢進を指標に *m*-Aminophenol および Vanillin を被験物質として検討した。その結果、Vanillin に対しては本実験のエンドポイントすなわち細胞増殖抑制に CYP 代謝活性化系はなんらの効果も示さなかったが、*m*-Aminophenol は CYP2E1 により代謝活性化されることにより細胞増殖抑制作用を

示す物質に変換されている可能性が示された。代謝活性化系を工夫し、細胞増殖抑制などの毒性を観察する系とを組み合わせることが有望ではないかと思われた。現在の系をより簡便に組むことを目標に代謝活性化反応を細胞毒性等で観察することを本線に、ヒト皮膚の毒性を観察できる系を確立できる見通しが立ったと考えている。

結論

種々の毒性物質をヒト代謝活性化を組み込んだ細胞系を開発し、皮膚腐食性試験や皮膚感作性物質の試験系に結びつけることを究極の目的として、今回チャイニーズハムスター細胞の増殖抑制作用を指標に、 $^{\circ}\text{C}$ 発現 CYP なし、ヒト CYP1A2 のみ、CYP1A2+NAT2 を導入した細胞系を用い、m-aminophenol, vanillin を被験物質として細胞増殖抑制作用を指標として試験した。また、予めヒト皮膚に存在すると言われている CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A5 で被験物質を代謝活性化反応を期待したプレインキュベーションを行うと m-aminophenol について、CYP2E1 による代謝活性化による細胞増殖抑制作用が認められた。ヒト皮膚に対する代謝活性化過程を組み込む試験系としては、生物活性の指標の問題や、代謝活性化系の共存方法の問題があるが、これらを克服しながら、in vivo に代替する試験法へ近づけていきたいと考える。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

G-1) 論文発表

なし

G-2) 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告書

「バリデーションデータの統計解析」（平成 17 年度研究）報告

分担研究者：大森崇

研究要旨

- ・ 【背景と目的】多施設共同バリデーション研究の主な目的は代替可能性と施設間再現性の検討である。このうち、代替可能性の評価では、感度、特異度、一致割合という指標が用いられることが多い。しかし、これらの指標が用いられる被験物質と参加施設の数に依存しており値の解釈が困難であるという事はほとんど議論されていない。また、代替法の結果はしばしば擬陽性という判定がなされることがある。これらの指標を用いる場合には、擬陽性となるデータになんらかの処置を施す必要がある。本研究では、上記の点を考慮した新しい指標を提案することを目的としている。
- ・ 【方法】提案する方法は、まず代替法で陽性と判定される割合を求め、次いで感度、特異度、一致度に対応する指標を計算という方法である。
- ・ 【結果】日本で実施されたある代替法のバリデーション研究の結果を適用した場合、感度、特異度、一致割合はそれぞれ 93.7%、40.0%、63.9%であった。一方、提案法を用いた場合、対応する指標はそれぞれ 84.4%、47.5%、63.9%となった。
- ・ 【結論】提案する方法は、感度、特異度、一致割合に対応する指標であり、代替法での擬陽性データを扱うことができる。また指標は被験物質のみに依存しているという解釈ができる。

A. 研究目的

動物実験代替法開発におけるバリデーション研究では、複数の施設がある代替法に同一の被験物質を適用したときに、

1. 代替法による実験結果が対象としている動物実験による結果と同様な判定を行うことが可能か（代替可能性）、
2. 施設間で同様な結果が得られるかどうか（施設間再現性）

が主な評価の目的となる（Balls ら（1999））。

代替可能性の評価方法として、しばしば感度、特異度、一致割合が用いられている（例えば Balls

ら（1990）、Roy ら（1994）、Spielmann ら（1998）、Sugiyama ら（2002））。これらの指標は、古くから医学の分野の診断テストの評価によく用いられてきた（例えば Altman ら（1994a））。そこでは新たに開発された検査の能力を調べるために、確定している診断結果による疾病の有無と新たな検査により判定された疾病の有無により構成される 2×2 の分割表からこれらの指標が計算される。代替法のバリデーション研究で使用される場合には、評価に用いられる被験物質について既存の動物実験による陽性と陰性の判定結果と性能を調べている代替法による陽性と陰性の判定から構成される

つであることが多い。一方、バリデーション研究では施設間再現性の評価が目的の一つとなるために、複数の施設から同じ被験物質の結果が得られる。また、実際に評価できる物質は限定されており、その中で可能な限り多くの種類の被験物質を研究に用いることが望ましいため、わが国における最近行われているいくつかのバリデーション研究では、すべての施設がすべての被験物質を実験するのではなく、施設によって異なる被験物質の評価を行うことが行われている。つまり、表2はバリデーション研究で得られる一般的なデータの形式を示しているといえる。

表2 ある代替法のバリデーション研究の結果

chemical	animal	alternative					
		a	b	c	d	e	f
A	P	P	E	E	P		
B	P	P	N	P	E		
C	N	P	P	P	P		
D	P	P	E	E		E	P
E	N	P	P			P	P
F	N	N	P			N	N
G	P			P	P	P	P
H	N			N	E	E	E
I	N			N	N	N	N

P: 陽性、N: 陰性、E: 擬陽性

B.3. 提案する方法

上述した第一点目の注意点は、指標が被験物質の選択に依存しているということであった。このことは、一つの被験物質を用いてバリデーション研究を行えば解決できる問題ではあるが、バリデーション研究の目的からは現実的ではないし、たとえそのような場合であっても得られた指標はその被験物質の場合の性能ということになる。そのため、指標はあくまでも研究に用いられた被験物質に基づく性能であるという点を注意して解釈すべきであり、どのような指標を用いても改善の余地はないであろう。しかしながら、第2、3点目の注意点については改善の余地がある。ここではこの2点を改善する方法を示す。

提案する方法は、2段階に分かれている。

- まず、代替法で陽性と判定される割合（陽性割合）を算出する、
- 次に、算出された陽性割合を用いて、感度、特異度、一致割合に対応する指標を計算するというものである。

第 i 物質における動物実験の判定スコアを x_i とする。このスコアは、もし動物実験の結果が陽性ならば1を、陰性ならば0をとることとする。第 i 物質における第 j 施設の代替法の判定スコアを y_{ij} とする。このスコアは、代替法の判定が陽性ならば1、陰性ならば0をとることとする。擬陽性がある場合にはこのスコアを0.5とする。また、第 i 物質の代替法の実験を行った物質数を m_i とし、すべての物質数を n とする。第 i 物質の陽性割合を以下のように定義して、 p_i と表現することにする。

$$p_i = \sum_j y_{ij} / m_i$$

p_i を用いた指標 q_i を以下のように定義する。

$$q_i = x_i p_i + (1 - x_i)(1 - p_i)$$

q_i は、被験物質ごとの施設間再現性の指標として利用できる。もしもこの値が0に近ければその物質について施設間再現性は極めて悪いこと示すことになり、1に近いほどこの指標は施設間再現性がよいことを示すことになる。

次に、本研究で提案する感度、特異度、一致割合を以下のように定義し、それぞれ P_{sn} 、 P_{sp} 、 P_{ac} と呼ぶことにする。

$$P_{sn} = \sum_i x_i p_i / \sum_i x_i,$$

$$P_{sp} = \sum_i (1 - x_i)(1 - p_i) / \sum_i (1 - x_i),$$

$$P_{ac} = \sum_i q_i / n = \sum_i (x_i p_i + (1 - x_i)(1 - p_i)) / n$$

もしも、各被験物質について、すべての施設が陽性または陰性を示すなら、 p_i は0か1のどちらかのみをとる値となる。その場合にはこれらの指

標はそれぞれ物質数に基づいた感度、特異度、一致割合に対応する。

C. 研究結果

表 3 は、表 2 に示されているデータを表 1 の形式にまとめたものである。ここでは、代替法の判定が擬陽性となった場合を陽性としている。

表3 2×2分割表へのまとめ

		動物実験	
		陽性	陰性
代替法	陽性	15 (P:10, E:5)	12 (P:9, E:3)
	陰性	1	8
		16	20

P:代替法で陽性、E:代替法で擬陽性

表 3 に基づいて感度、特異度、一致割合を計算するとそれぞれ、93.7% (15/16)、40.0% (8/12)、63.9% (23/36) となる。もしも感度と一致度の計算に擬陽性データは含まないというようにすれば、それぞれ 62.5% (10/16)、50% (18/36) となる。

一方、提案法を用いた場合、Psn、Psp、Pac はそれぞれ 84.4% (3.38/4)、47.5% (2.37/5)、63.9%(5.75/9)となる。

上記の計算結果の違いは擬陽性の扱いの違いによっている。しかし、それはすべての被験物質で施設の繰り返し数と同じ場合にのみになり立つことであり、より一般には異なることになる。

D. 議論

すでに述べたように、既存の指標は選択された被験物質の種類だけでなく施設数にも影響をうけることになる。このため、2×2 の分割表を作成してしまえば計算はたやすいが、解釈は困難なものになってしまう。一方提案法では、分母が被験物質の数という指標となっているために、被験物質のみに影響を受ける指標であると解釈できる。上記のデータでは、擬陽性データを 0.5 として既存の

指標を計算すれば、提案法と同様の結果を得ることができるが、被験物質によって実験実施施設が異なる場合には異なることになる。その違いは、既存の方法が延べ被験物質数をあたかもすべて異なる被験物質であるように扱うことによっている。提案法は、あくまでも研究で用いらた被験物質数に基づき評価指標を構成するべきであるということを反映している。

本報告は、感度、特異度、一致割合という代替可能性の評価の指標を検討しているが、提案法を計算する上で用いる陽性割合 p_i を用いて算出される q_i は被験物質 i における一致割合であり施設間再現性の指標として利用することができる。施設間再現性は、物質ごとに異なる可能性があるので、個々の物質についてこのような指標で評価することは有用であろう。実際、Spielmann ら(1998)は、これとは逆の不一致割合を彼らのバリデーション研究の評価に利用している。

提案する方法では、陽性割合 p_i を用いて施設間再現性を要約することにより、被験物質数に基づいた指標を構成している。 p_i による要約は、施設間の違いは単に誤差的なばらつきによっているということを仮定していることになる。この仮定は特定のある施設が実験手順書を十分に理解していなかったというような施設間差までもは反映できていない。表 2 のデータのように、一つの被験物質について各施設は一度しか実験結果が得られていないときにはこの仮定をおかざるえないが、もしも各施設が複数回同じ被験物質について実験を行っていたら、さらに施設間の要因を統計的に調整した陽性割合 p_i を計算することも可能となる。例えば陽性割合 p_i を多項ディレクレ分布でモデル化することが考えられる。いずれにしても、提案法は、陽性割合 p_i について算出することにより施設と物質という要因を区別することが特徴であり、またそれを行うことにより施設間差の考慮などの

さらなる拡張を反映させることができるという利点がある。

従来、擬陽性データは、評価を行ううえで厄介な問題の一つであった。なぜならば、この領域の物質をどのように扱うかにより指標の結果が異なるためである。提案法では、擬陽性データは、0.5というスコアを与えている。これは陽性となる確率が 1/2 であるということを反映させていることになる。判定カテゴリーを得る前のデータの値に基づきより詳細な設定が可能であるかもしれないが、データに含まれるばらつきを考慮するとあまり複雑な設定は望ましくないであろう。

提案法では、被験物質ごとに陽性割合 p_i を算出し、次いで被験物質数を反映させる形で感度、特異度、一致割合に相当する指標を算出している。これとは逆に、施設ごとに感度、特異度、一致割合を算出し、これらの指標の分布から平均を求めるとすることも考えられる。この方法は簡単であるが、表 2 のようにすべての施設が同じ被験物質の実験を行っているわけではない場合には、指標の平均値の解釈は困難なものとなるだけでなく、個々の施設での指標を計算する際の被験物質数が少なくなってしまう。特に表 2 に示す程度の物質数ではきわめて不安定な値となる。また、この場合、既存の方法と同様に擬陽性データの対処も行う必要が生じることになる。

2×2 の分割表の解析では、感度、特異度のよう動物実験で評価された物質数を基にするのではなく、実験結果である代替法の指標に基づく陽性予測値、陰性予測値という指標が算出されることが多い。代替法により動物実験の結果を予測できるかという観点からはこれらの指標の方が理にかなっているようにも思われるが、バリデーション研究の計画段階で我々が調整できるのは動物実験の結果に基づいた被験物質の選択であり、代替法の結果ではない。さらに、そのようにして得

られる陽性予測値、陰性予測値は結局バリデーション研究で用いられた被験物質に依存する。本来予測値の指標として利用するには他の情報が必要となるのが一般にはよく知られている（例えば Ball ら (1990)、Altman ら (1994b)）。したがって、この研究では、バリデーション研究の評価の指標としては感度、特異度、一致割合を用いることとしており、陽性予測値と陰性予測値には言及しない。

E. 結論

多施設で実施されるバリデーション研究で算出される感度、特異度、一致割合は被験物質と施設数に依存している。代替法の判定に擬陽性がある場合には何かしらの対処を行わなくてはならない。本研究では、被験物質のみに依存する感度、特異度、一致度を提案した。さらに、この提案では代替法の結果が擬陽性と判定されるデータも扱うことができる。

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

- Altman, D. G. and Bland, J. M. (1994a) Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity, *BMJ*, 308, 1552.
- Altman, D. G. and Bland, J. M. (1994b) Diagnostic tests 2: predictive values, *BMJ*, 309, 102.

- Balls, M. and Fentem, J. H. (1999) The validation and acceptance of alternatives to animal testing, *Toxicology in Vitro*, 13, 837-846.
- Balls, M., Blaauboer, Bas., Brusick, D., Frazier, J., Lamb, D., Pemberton, M., Reinhardt, C., Roberfroid, M., Rosenkranz, H., Schmid, B., Spielmann, H., Stamatii, A.-L. and Walum, E. (1990) Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures, *ATLA*, 18, 313-337.
- Roy, T. A., Saladdin, K. A. and Mackerer, C. R. (1994) Evaluation of the EYTEX system as a screen for eye irritancy of petroleum products, *Toxicology in Vitro*, 8, 797-798.
- Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J., Pechovitch, G., de Silva, O., Holzhütter, H.-G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998) The international EU/COLIPA In vitro phototoxicity validation study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1: The 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro*, 12, 305-327.
- Sugiyama, M., Itagaki, H., Hariya, T., Murakami, N. and Kato, S. (1994) In Vitro assay to predict phototoxicity of chemicals: (I) Red blood cell hemolysis assay, *AATEX*, 2, 183-191.
- Sugiyama, M., Mori, M., Hoya, M., Hirota, M. and Itagaki, H. (2002) A strategic approach for predicting phototoxicity of chemical ingredients, *AATEX*, 9, 29-39.