

図 11 2-Hexanone の 4 細胞における細胞毒性試験結果

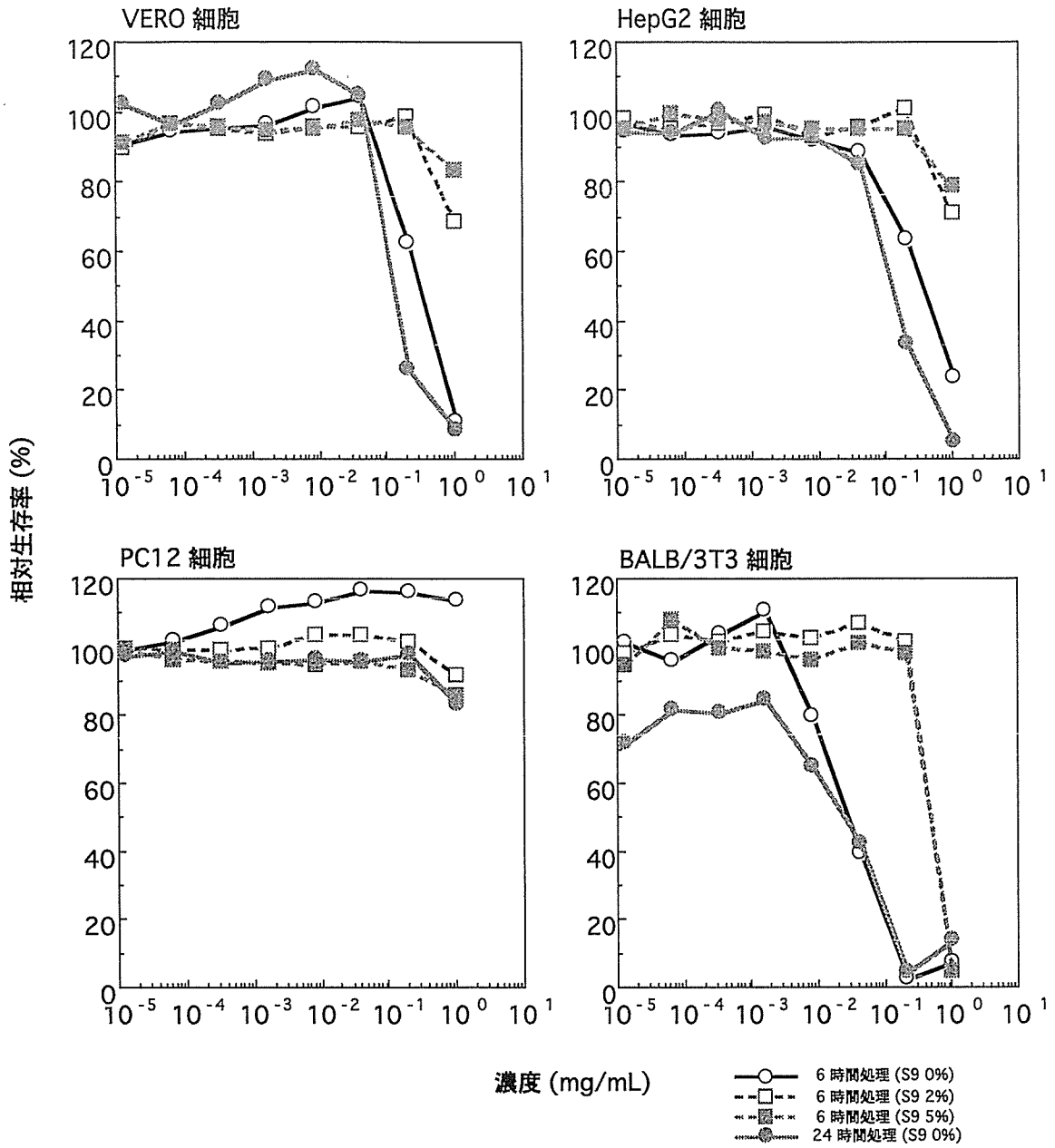


図 12 Malathion の 4 細胞における細胞毒性試験結果

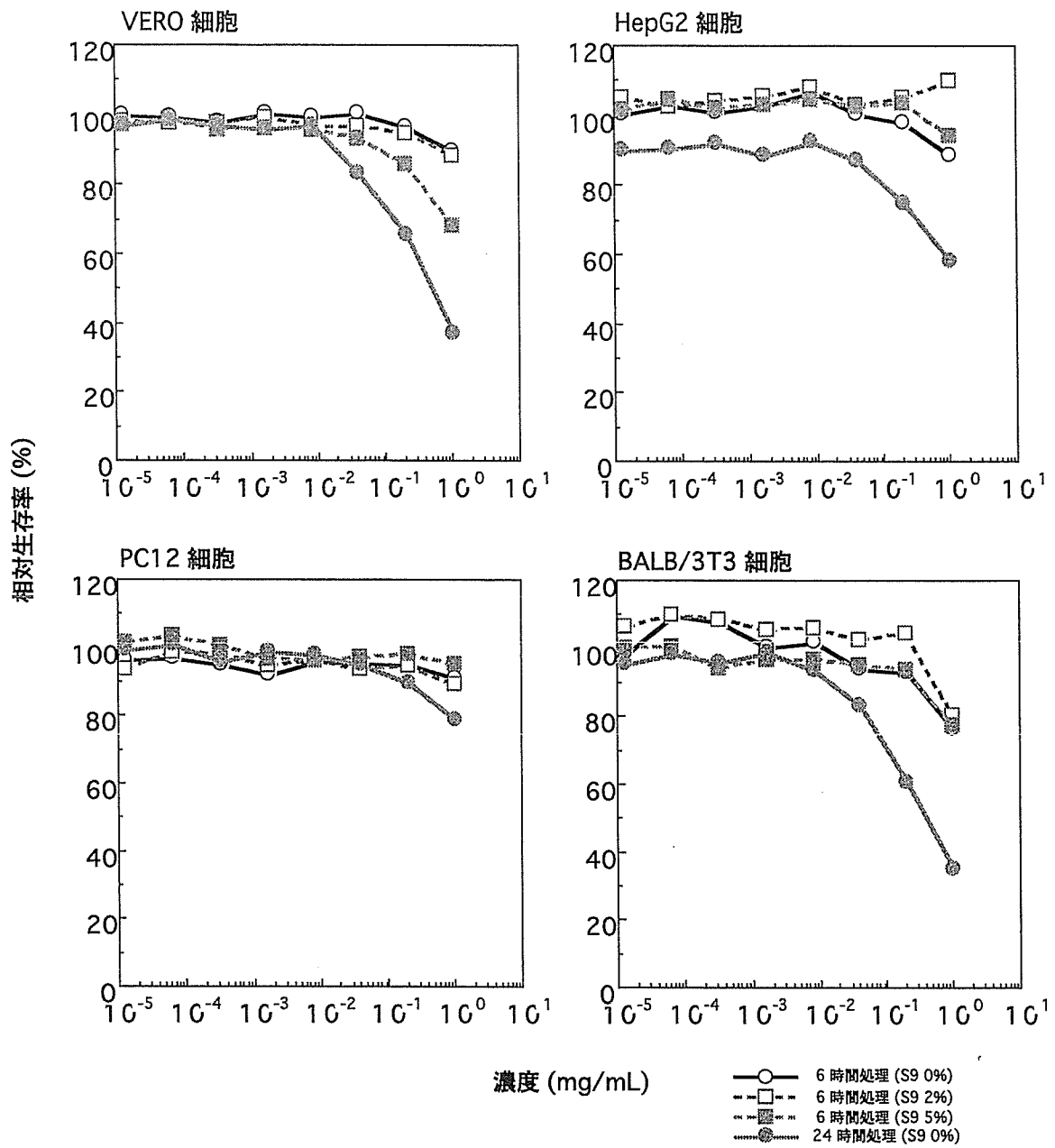


図 13 Caffeine の 4 細胞における細胞毒性試験結果

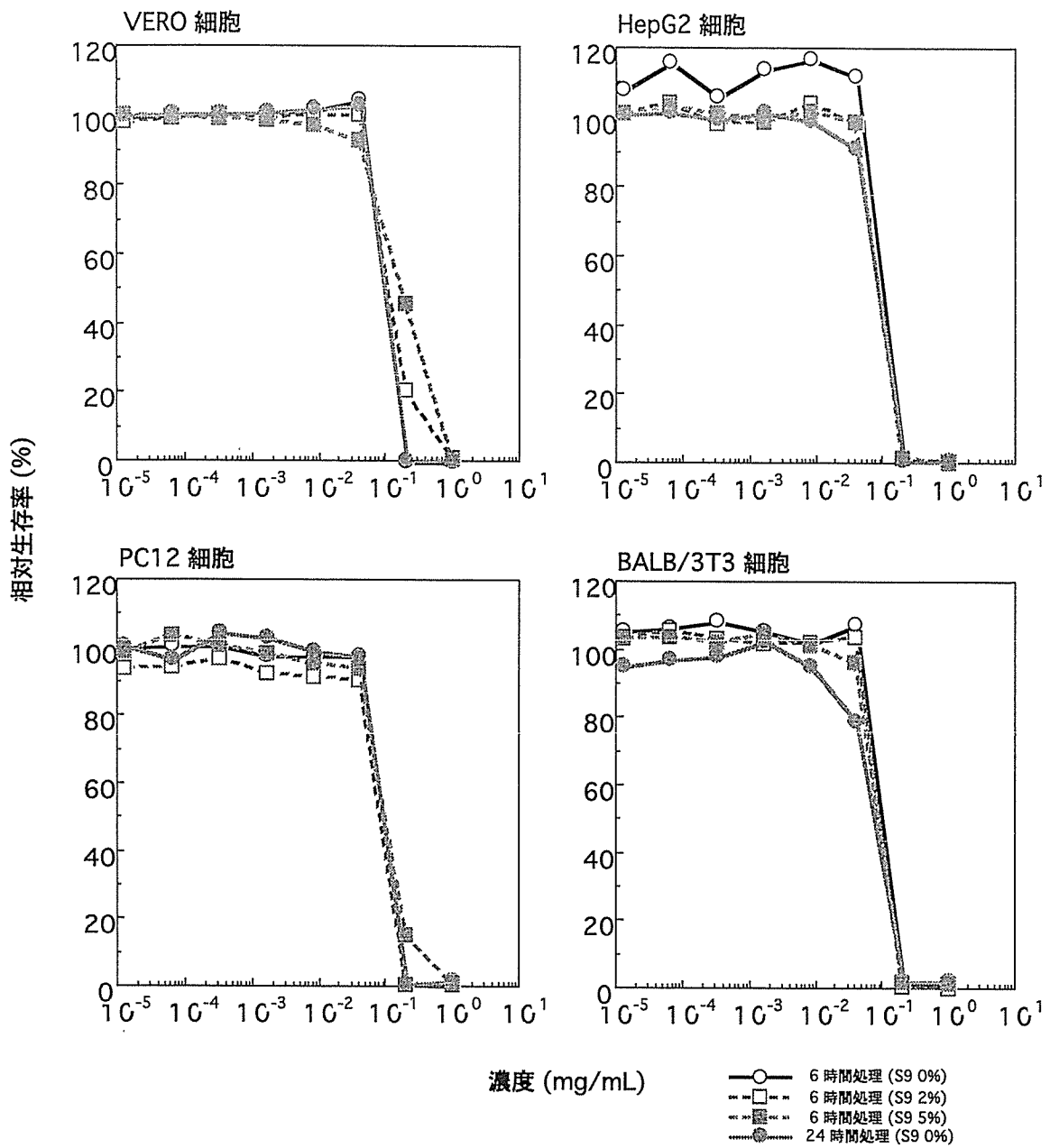


図 14 Sodium lauryl sulfate の 4 細胞における細胞毒性試験結果

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

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
荒川京子、田中憲穂、高鳥浩介、澤田拓士	飼料から分離した代謝産物の遺伝毒性	Mycotoxins,	56 (2)	7-64	2006
Ayako Sakai, Chihiro Suzuki, Yasuhiko Masui, Kousuke Takatori and <u>Noriho Tanaka</u>	The activities of Mycotoxins derived from Fusarium and related substances in a short-term transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/3T3 cells (Bhas 42 cells)	Mutation Res			In press
Yoshitaka HIGA, Mayumi KAWABE, Kyoko NABAE, Yosuke TODA, Sachiko KITAMOTO, Takumi HARA, <u>Noriho TANAKA</u> , Kimio KARIYA and Michihito TAKAHASHI	Kojic acid - absence of tumor -initiating activity in rat liver, and of carcinogenic and photo-genotoxic potential in mouse skin	The Journal of Toxicological Sciences			In press
Takumi Hara, Takashi Nishikawa, Hajime Sui, Kumiko Kawakami Hirota, Matsumoto and Noriho Tanaka	In vivo photo skin micronucleus test using a sunlight simulator: Detection of 8-methoxypsoralen and benzo[a]pyrene	Mutation Res			In press
Hayashi, K., Sasaki, K., Asada, S., Tsuchiya, T., <u>Tanaka, N.</u>	Umeda, M.: Detection of initiating and promoting activities of chemicals by two-stage model of Balb/c 3T3 cell transformation assay with optimized protocol.	ATLA			In press

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

ヒト皮膚に発現するシトクロム P450 分子種は、化粧品原料等の化学物質の代謝活性化に関与し、皮膚に対する障害性の一因となりうる。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 や CYP1A2 とアセチル化酵素 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として検討した。ヒト皮膚発現 CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A5 のバキュロウィルス系リコンビナント酵素と、化学物質を代謝反応後、チャイニーズハムスター細胞（CHO）系に暴露し、細胞増殖抑制作用を指標にして代謝活性化、不活性化を検討し、有用と思われるスクリーニング系を構築した。

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ことである。被験物質の種類により、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、既存の *in vitro* 代替法試験を用いると *false negative* になる可能性がある。本研究では、被験物質と薬物代謝酵素による代謝反応の結果として、被験物質がより細胞毒性代謝物となるか、解毒的代謝物となるかを評価できる細胞系の構築を目指している。今回、哺乳動物細胞を用いた細胞毒性を指標にして、ヒト皮膚における発現が認められる種々シトクロム

P450（CYP）分子種を中心に被験物質の代謝活性化、および解毒的代謝能を評価する系を構築した。

B. 研究方法

B-1) 皮膚に発現している薬物代謝酵素分子種をコードする cDNA の単離

前項の方法で皮膚での発現が認められた CYP 分子種につき、cDNA を Genecopoeia 社から購入、または、全長を増幅可能なプライマーで増幅し、哺乳動物発現ベクター pCR3.1 に組み込んだ。

B-2) シトクロム P450 の一分子種 CYP1A2、およびアシルアミン N-アセチル転移酵素 NAT2 を組み込んだチャイニーズハムスター細胞による生体外異物の代謝活性化

シトクロム P450 の一分子種、

CYP1A2、およびアリルアミン N-アセチル転移酵素 NAT2 の両方を組み込んだチャイニーズハムスター卵巣由来細胞 CHO を Dr. J. S. Felton (Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore CA) から供与いただいたものを用いた。これら細胞に種々の被験物質を 37°C、24 時間作用させ、その細胞死をコロニー形成率が 37% に減じる被験物質の濃度をもって被験物質の毒性の強度とした。

B-3) ヒト皮膚に発現するシトクロム P450 による各種化学物質の代謝と、代謝活性化および不活性化の評価

ヒト皮膚に存在することが知られている CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A5 (表 1) 発現昆虫細胞由来マイクロソーム (バキュロウィルス系、商品名 Supersome, GENTEST) と被験物質 (*m*-Aminophenol, *p*-Aminophenol, β -Estradiol, Eugenol, Isoeugenol, Alizarin, and Quinizarin) を被験物質の終濃度 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反応させた (反応系液量 100 μ l)。CYP 発現細胞由来マイクロソームの対照群として、CYP を発現していない昆虫細胞由来のマイクロソームを用いた。反応系に加えた CYP は 1 pmole に統一し、代謝活性化反応に電子伝達系として 0.3 mM NADPH を加えた。この反応を 24 穴プレートで行った

(図 1)。その後、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞亜株である CHO/UV5 細胞をウェルあたり 3000 個を播種した 96 穴プレートに前記反応液 100 μ l を加え、さらに 7 日間培養した。培養後、細胞内ミトコンドリア還元能力を生存細胞の指標とする

Promega 社の CellTiter-Blue キットを用いて細胞の生細胞数を測定した (図 2)。この生細胞数測定結果から、前記 5 種の CYP 分子種による代謝反応を通じて細胞増殖抑制作用が亢進するかあるいは低下するかにつき評価した。なお、CHO/UV5 細胞は、遺伝子と付加体を作り傷害性を発揮する物質群に対する DNA 修復能を欠損している。

C. 研究結果

C-1) 皮膚に発現している薬物代謝酵素分子種をコードする cDNA の単離

CYP2A6, CYP2E1, CYP3A5, CYP4B1 はヒト肝にも発現が認められていることが知られている。そこで、ヒト肝 polyA+RNA (Clontech) を購入し、Reverse transcriptase-PCR 法で全長 cDNA を単離した。その他の CYP1B1, CYP2C (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19)、CYP2D6 は Genecopoeia 社から購入した。これらについては、塩基配列を確認し、それぞれ野生型の CYP 分子種をコードしていることを確認した。

C-2) シトクロム P450 の一分子種 CYP1A2、およびアリルアミン N-アセチル転移酵素 NAT2 を組み込んだチャイニーズハムスター細胞による生体外異物の代謝活性化

CYP1A2 単独、および CYP1A2+NAT2 の細胞について、ヘテロサイクリックアミンの障害性を比較した。IQ については NAT2 の影響が出ているが、NAT2 をさらに組み込んでも細胞毒性が強くなるはなかった。それに対し、PhIP については NAT2 を発現した細胞で、CYP1A2 単独より細胞毒性が強くと発現した。このことより、これ

らヘテロサイクリックアミンについては、細胞障害性が代謝活性化酵素の導入により確認された。

C-3) CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A5 発現昆虫細胞由来マイクロソーム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変動の検討

被験物質として選定した *m*-Aminophenol, *p*-Aminophenol, β -Estradiol, Eugenol, Isoeugenol, Alizarin, and Quinizarin をバキュロウイルスによる cDNA 発現系で昆虫細胞マイクロソーム画分に発現した CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A5 とプレインキュベートした後、CHO /UV5 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 を含有しないマイ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。

C-3-1. Eugenol, isoeugenol の CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A5 が触媒する代謝反応の細胞毒性への影響

Eugenol の CYP3A5 による代謝後の細胞数減少が見られたが、用量相関性がなく、再試験が必要と考えられた。

Isoeugenol についても CYP1B1, CYP2D6, (CYP3A5) による代謝不活性化が

示唆されたが、これら分子種を中心に再試験による確認が必要である (図 3)。総体に、いずれの CYP でも明確な細胞増殖抑制の亢進は認められなかった。

C-3-2. *m*-Aminophenol の CYP1A2, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A5 が触媒する代謝反応の細胞毒性への影響

高濃度の本被験物質では CYP 非存在でも本薬依存的な生細胞数減少が見られた。

CYP1B1 による生細胞数減少の亢進は、細胞毒性のある代謝物の生成を触媒することを示唆するものと考えられた (図 4, $p < 0.05$)。

C-3-3. *m*-Aminophenol の CYP1A1, CYP1B1 が触媒する代謝反応系の限外ろ過の細胞毒性への影響の評価

B 項、研究方法で述べた CYP の反応系にはタンパク性の高分子が含まれるので、それを除くため限外ろ過を行ってから

CHO/UV5 細胞系に加え、細胞細胞毒性の評価をすることを試みた。*m*-Aminophenol の代謝活性化反応液を Microcon YM-10 (Amicon) で室温 30 分間の限外ろ過後、細胞が成育するウェルに加えた。

本実験で初めて、CYP1A1 を試験に加えた。CYP1B1 より活性化能が強い可能性があった (図 5, $p < 0.05$)。CYP1B1 の場合と同様に、細胞毒性に関する結果を検証すると共に、生成する代謝物の構造を明らかにすることは興味深い。種々の代謝活性化反応後の溶液を h-CLAT 等皮膚感作性評価系に加えることを試みる価値があるかもしれない。

C-3-4. *p*-Aminophenol の CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1 が触媒する代謝反応の細胞毒性への影響

本被験物質は類似物質 *m*-Aminophenol に比べ細胞毒性が強かった。これら CYP 非存在でも 33 μ M 以上の濃度では本薬依存的かつ濃度依存的な生細胞数減少が見られた (図 6)。本物質に対しては CYP1B1 とのインキュベーションによりむしろ生細胞数減少が抑えられていた。原体より細胞毒性が低い代謝物の生成を触媒することを示唆

するものと考えられた (図 6、 $p < 0.02$)。代謝反応による構造変換を調べる必要があると思われた。

C-3-5. Alizarin, Quinizarin の CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1 が触媒する代謝反応の細胞毒性への影響

Quinizarin は類似物質 Alizarin に比べ細胞毒性が強かった。これら CYP 非存在でも前者は $57 \mu\text{M}$ 以上の濃度、後者では $167 \mu\text{M}$ 以上の濃度で本薬依存的かつ濃度依存的な生細胞数減少が見られた (図 7)。

Alizarin に対しては CYP2E1 とのインキュベーションによりむしろ生細胞数減少が抑えられていた。原体より細胞毒性が低い代謝物の生成を触媒することを示唆するものと考えられた (図 7、 $p < 0.01$, $p < 0.05$)。代謝反応による構造変換を調べる必要があると思われた。

C-3-6. β -Estradiol の CYP1A1, CYP1B1 による代謝活性化反応

β -Estradiol は CYP1A1 や CYP1B1 による代謝活性化が起こり、より細胞毒性が亢進する代謝物に変換されることが知られている。本アッセイ系でこれら CYP 分子種による代謝活性化による細胞生存数の顕著な減少がみられた (図 8、 $p < 0.02$, $p < 0.001$)。

D. 考察

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、第一段階として、ヒト CYP1A2 と NAT2 を導入した細胞系をヘテロサイクリックアミンを被験物質として殺細胞作用を指標として試験した。ヘテロ

サイクリックアミンの種類により、代謝活性化の経路が異なり、PhIP では、文献的に考察されているように、CYP1A2、NAT2 とともに代謝活性化に関与していることが確認された。

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, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A5 による種々化学物質の代謝による生物活性の修飾 (代謝活性化ないし解毒的代謝) をチャイニーズハムスター卵巣由来細胞垂株 CHO/UV5 細胞の増殖抑制作用を指標に被験物質として選定した *m*-Aminophenol, *p*-Aminophenol, β -Estradiol, Eugenol, Isoeugenol, Alizarin, and Quinizarin について検討した。その結果、Eugenol, Isoeugenol 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 代謝活性化系は明瞭な結果が得られなかったが、*m*-Aminophenol については CYP1A1 や CYP1B1 による代謝活性化がおこると考えられた。*p*-Aminophenol については CYP1B1 による解毒的代謝が示唆された。Alizarin に対しては CYP2E1 による解毒的代謝が示唆された。 β -Estradiol について文献的に知られている CYP1A1, CYP1B1 による代謝活性化反応が再現され、現在の系は代謝活性化反応や解毒的代謝反応を細胞毒性等で観察することをできる系と思われた。本系を応用することで、ヒト皮膚の毒性が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。代謝活性化あるいは解毒的反応の部分、各種 CYP 分子種の発現細胞を用いることは発現量の点から本研究期間中では困難であった。しかし、CYP の発現効率を上昇させる工夫をさらに続ける

べきであると考えられた。

E. 結論

種々の毒性物質をヒト CYP による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、本研究事業は開始された。ヒト CYP を組み込んだ系はその発現レベルが低く困難を極めた。そこで、予めヒト皮膚に存在すると言われている CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6, 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アッセイ系を確立した。*m*-Aminophenol については CYP1A1 や CYP1B1 による代謝活性化がおこると考えられた。*p*-Aminophenol については CYP1B1 による解毒的代謝が示唆された。Alizarin に対しては CYP2E1 による解毒的代謝が示唆された。 β -Estradiol について文献的に知られている CYP1A1, CYP1B1 による代謝活性化反応が再現され、現在の系は代謝活性化反応や解毒的代謝反応を細胞毒性等で観察することをできる系と思われた。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をヒト CYP 発現細胞で行うことは実現できなかったが、これらを克服しながら、*in vivo* を代替する試験法へ近づける方策を模索し続けることは非常に意義があると考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

G-1) 論文発表

Ohtake E, Kakihara F, Matsumoto N, Ozawa S,

Ohno Y, Hasegawa S, Suzuki H, Kubota T.

Frequency distribution of phenol sulfotransferase 1A1 activity in platelet cells from healthy Japanese subjects. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Epub ahead of print Apr 16 (2006)

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 18 年度研究）報告

分担研究者：大森崇

研究要旨

[背景と目的]バリデーション研究では、さまざまな役割の研究者が研究に関与することになる。筆者はモルモットを用いた皮膚感作性試験の代替法として使用できることが期待される LLNA・DA 法のバリデーション研究に携わってきた。この試験法では、LLNA 法と同様に感作を評価する指標である SI の値が用いられ、データ解析ではこの値のばらつきを考慮する必要がある。しかし SI の分散については十分に検討がおこなわれてこなかった。また、LLNA・DA 法のバリデーション研究では SI の値にもとづき定量的に施設間再現性を評価するための指標も必要であった。そこで、本年度の第 1 の研究目的として SI の分散の導出と施設間再現性の指標の提案および評価とした。

LLNA・DA 法のバリデーション研究では、研究計画書の作成、実験手順書の繰り返しの確認と改訂し、技術研修と予備実験の実施を行った。そこで、第 2 の研究目的として、これらの重要性を記述し、研究全体の遂行プランを示すこととした。

[方法]第 1 の目的について、SI の分散の導出にはデルタ法を用いた。施設間再現性の導出には、各施設から得られる対数変換を施した SI の値とその分散を与えたもとの、各施設の位置パラメータの分散を用いて施設間差の指標とした。第 2 の目的について、研究計画書、実験手順書、技術研修、予備実験が何であるのか、その利点は何かを記載した。

[結果]第 1 の目的について、公表されている LLNA 法のデータを用いて検討した結果、OECD テストガイドラインで示唆されている方法を用いると過小評価になる可能性があることがわかった。一方、デルタ法を用いた方法では SI の値が大きなところで、極端に大きな値になる傾向があった。施設間差の指標は個々の SI の分散の値を考慮した施設間の変動を捕らえていた。第 2 の目的について、LLNA・DA 法のバリデーション研究での研究過程をもとにした研究遂行プランを示した。

[結論]本研究の成果は、LLNA・DA 法のバリデーション研究の定量的な評価を可能にした。バリデーション研究はさまざまな役割の研究者によって実施されるものである。各研究者の研究目的や役割に関する認識を共有することが重要である。

A. 研究目的

(代替可能性)、

- バリデーション研究は、
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
 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）
- の 2 点を主に評価することを目的とする研究であ

る (Ball and Fentem, 1999; OECD, 2005)。これらの目的を達成するために、被験物質の選定、被験物質の割付、試料の配布、実験の実施、データ解析等、さまざまな役割の研究者が研究に関与することになる。筆者は、モルモットを用いた皮膚感作性試験の代替法として知られている LLNA (Local lymph node assay) 法の修正版である LLNA-DA 法 (Yamashita, 2005) のバリデーション研究に携わってきた。

LLNA 法では、 ^3H -thymidine の取り込み量がマウスのリンパ節細胞増殖反応として測定されるのに対して、LLNA-DA 法では ATP 発光量が測定されるという違いがある。しかし、どちらも感作性の指標として、被験物質群の平均的な測定量と溶媒対照群の平均的な測定量の比が用いられる。この比は Stimulation index (SI) と呼ばれている。LLNA 法は OECD テストガイドライン 429 によってその詳細が記載されている (OECD, 2002)。このガイドラインでは、データ解析方法として、SI のばらつきの評価に、分子である被験物質群のみのばらつきを考慮することが示唆されている。しかし、分母である溶媒群で測定される ^3H -thymidine の取り込み量や ATP の発光量もばらつきをとまなうので、考慮すべきであろう。そこで、溶媒群のばらつきも考慮した SI の分散を導出することにした。SI の分散を算出することで、個々の施設で得られる SI とその分散の値が計算できることになるので、それらを用いて施設間再現性の指標を導き、LLNA-DA 法のバリデーション研究で使用することにした。本研究の第 1 の目的は SI の分散の導出とその分散を持った施設間再現性の指標の提案である。これらの検討を LLNA 法のデータを用いて行うことにした。

LLNA-DA 法のバリデーション研究では、過去に筆者が経験したバリデーション研究のいくつかの反省点を反映させた。それは、研究計画書、実

験手順書の作成と繰り返しの確認および改訂、技術研修と予備実験の実施である。これらはバリデーション研究を適切に行う上で重要な要素であるにもかかわらず、あまり強調はされてこなかった。さまざまな役割の研究者がいつ、どのように研究にかかわるかを把握するためには、研究全体の見通しが少なくとも実験を実施する以前に把握できることが研究の遂行に有意義であるように思われる。そこで、本研究の第 2 の目的として、研究計画書、実験手順書、技術研修、予備実験の重要性を記述するとともに、LLNA-DA 法のバリデーション研究をもとに作成した研究遂行におけるプラン案を示すことにする。

なお、LLNA-DA 法のバリデーション研究そのものの研究結果は、主任研究者である大野の報告の一部に含まれている。

B. 研究方法

B.1. SI の分散の導出

LLNA 法では、 ^3H -thymidine の取り込み量がベータ線のシンチレーションカウンターによって 1 分間あたりの崩壊数 (DPM: disintegrations per minute) として測定される。

被験物質群を示す記号を Y、溶媒群を示す記号を X で表すことにし、1 回の実験の被験物質群、溶媒群の平均 DPM をそれぞれ Mean(Y)、Mean(X)、DPM の標準誤差をそれぞれ SE (Y)、SE (X) とする。ここで、平均や標準誤差を計算する際の繰り返しの単位は個体である。SI は被験物質群の平均 DPM をその被験物質の溶媒群の平均 DPM で除した

$$SI = \frac{\text{Mean}(Y)}{\text{Mean}(X)} \quad (1)$$

となる。SI の分散を Var(SI) とする。OECD テストガイドライン 429 が示唆する記載に従うと、この分子のみのばらつきを考えているので、

$$\text{Var}(SI) = \frac{SE(Y)^2}{\text{Mean}(X)^2} \quad (2)$$

となる。しかし、これでは分母のばらつきが無視されているので、感作性が低い物質ではばらつきが過小評価になるかもしれない。分母のばらつきを考慮する方法として、デルタ法として知られている近似の適用が考えられる。この方法を用いると

$$\text{Var}(SI) = (SI)^2 \times \text{Var}(\ln SI) \quad (3)$$

ただし

$$\text{Var}(\ln SI) = \frac{SE(Y)^2}{\text{Mean}(Y)^2} + \frac{SE(X)^2}{\text{Mean}(X)^2} \quad (4)$$

となる。

Lovelessら(1996)は、7物質について5施設からなるLLNA法のバリデーション研究の結果を報告している。そのうち3施設については、被験物質とその溶媒についてDPMの平均値と標準誤差が示されているため、3施設について式(2)、式(3)により分散を計算し、両者の違いを検討した。

B.2. 施設間再現性の指標

バリデーション研究の目的のひとつは施設間差の検討がある。LLNA法は、この目的のためにいくつかのバリデーション研究が行われている(たとえば、Basketter et al., 1991; Kimber et al., 1991a, 1995b, 1998c; Loveless et al., 1996; Scholes et al., 1992)。しかし、筆者が知る限りSIの施設間差を定量的に評価した研究はない。そこで、ここではその指標を提案する。

第*i*施設のSIとその分散をそれぞれ SI_i 、 $\text{Var}(SI_i)$ とする。対数変換を施した第*i*施設のSIである $\ln(SI_i)$ が施設ごとに異なる正規分布 $N(\theta_i, \text{Var}(\ln(SI_i)))$ に従うとする。さらにその位置パラメータ θ_i が全施設共通に $N(\theta, \tau^2)$ に従うことを仮定する。このとき、尺度パラメータ τ^2 は、施設間のばらつきを表しているため、その推定値を指標として用いることができるであろう。ただし、これは対数変換を

施したSIのスケールなので、指数をとった $\exp(\tau^2)$ を施設間差の指標として用いることを提案する。

この値の最小値は1となるので、1に近いほど施設間差が小さいことになる。

指標の特徴を調べるために、Lovelessら(1996)のデータを適用した。ここで、 τ^2 の推定にはSAS MIXED Procedureの制限付き最尤法によって求めた(Normand, 1999)。

B.3. バリデーション研究のマネジメント

バリデーション研究では、異なる役割を携わる研究者が組織的に機能する仕組みづくりが必要となる。しかし、初めてバリデーション研究を計画する多くの研究者がバリデーション研究を単に複数の施設で実施する研究ととらえていることが多いようにみうけられる。その場合、新たに開発された代替法を実施可能な施設を集めることのみが力が注がれることになり、他のことについてはおろそかになっているように思われる。筆者は、国内で実施された複数のバリデーション研究に主に統計家という立場で参加してきた。その際、研究の計画段階で、開発された代替法の実験をどのように行うかという議論に比べて、バリデーション研究そのものをどのように行うかというに関する議論があまりに少ないと感じるようになった。筆者がこのように感じる理由は、バリデーション研究のデータ解析を行う際に、しばしば、その目的を確認すると明確な答えを得ることができない場合があったからである。これではバリデーション研究の目的は達成できないであろう。バリデーション研究はひとつの研究である。研究を実施する際には、その目的を明確にすること、そして計画段階で研究の検討を行うことが必要である。

現在、筆者は研究計画書と実験手順書の作成、技術研修と予備実験の実施が、バリデーション研

究によってを遂行する上で重要であると考えている。これらについて以下に記述する。

研究計画書

研究計画書は、そのバリデーション研究で何を目的としているか、どのような役割のものがどのような手順で実施するかを明確にするための文書である。

研究計画書として、文書化することの利点は、これを研究者が共有することで

- ・ すべての研究者が共通の目標に向かい研究を遂行できる、
- ・ だれが何について責任を持っているのかを明確にできる、
- ・ 現在この研究がどの段階であるかを把握できる

ということである。この利点は、異なる背景や経験を有する複数の研究者が実施するバリデーション研究では、重要である。

その他の利点としては、完全に固定されなくても大まかな研究計画書案を参加施設の公募の際に公表することで、研究に参加することを検討する施設の判断材料とすることができることである。

また、研究計画書は現在実施している研究を第三者に説明する際の妥当性を主張するものに用いることができるであろう。

実験手順書

実験手順書は、バリデーション研究の対象となる代替法の実験を実施するための手順を記載した文書である。この文書はたいていの場合、試験法の提案者が中心になって作成される。

しばしば実験手順書は、より広範な施設環境に適用できるように一般化されたものが作成されることがある。しかし、筆者らは、バリデーション研究用の実験手順書を作成するようにしている。このことを利点は、

- ・ 施設ごとに行なわれた異なる手順により生じる結果の乖離を、小さくすることができることである。

実験手順書は、技術研修や予備実験などで明らかになった問題点について、本実験までに解決し、適宜改訂が行われるべきである。その際、実験実施施設での実験が実施可能性を十分に考慮するべきである。また、最新版がどれであるのかが明確にできるようにし、誰が改訂に責任をもっているのかを明確にしておくべきである。

技術研修

技術研修は、開発された試験法の実験手順をバリデーション研究に参加する実験実施施設に正しく伝えるための実技の研修である。通常、この研修は、バリデーション研究の対象となる代替法の開発者によって行われる。

技術研修を実施する利点は、

- ・ 実験手順書に記載された内容を確認できる、
 - ・ 実験手順書に記載するほどでもない事項についての詳細を確認できる、
 - ・ 簡易な実験を通して、実験手順書に追記しなくてはいけない必要事項を知ることができる、
- ということである。

現実には、技術研修での質問などを通して各施設の実験の実施方法の違いが明らかになり、調整を行うことが多い。このため、筆者は技術研修はバリデーション研究をうまく行うための必須の事項であると考えている。

過去の経験として、技術研修に参加した者とは別の者が実験を行い、結果としてうまくいかなかったことがある。原則として、実験実施施設で実験を行うものは、技術研修に参加すべきである。

予備実験

ここでの予備実験とは、バリデーション研究で計画している実験がうまくいくかどうかを調べるための多施設で実施する小規模な実験である。そ

の目的は、バリデーション研究の本実験に入る前の実験手順の確認であったり、本実験で用いる用量を各施設で決定したりするためであったりする。

予備実験を行い、その結果を検討することの利点は

- ・ バリデーション研究を行う前にその実験手順で十分に施設間再現性を評価できるかどうかを調べることができる、
- ・ 実験手順書に記載すべきことを見直すことができる
- ・ 実験の手順や資料の配布、データの記入などの手順を見直すことができる、

ことである。

筆者らが実施した LLNA・DA 法のバリデーション研究では、予備実験も含めて研究計画書を作成しているが、場合によっては予備実験のための研究計画書を別に定めることも考えられる。

上記に示した、研究計画書と実験手順書を作成すること、技術研修と予備実験を実施することは研究の計画の段階で考慮されなくては行なうことができない。つまり、これらを個別に考えるのではなく、バリデーション研究の全体像を把握しておく必要がある。本研究の研究結果のひとつとして LLNA・DA 法のバリデーション研究をもとに作成した研究の遂行プランを次節 (C.3) に示すことにする。

C. 研究結果

C.1. SI の分散の比較

表 1 は、Loveless ら (1996) が報告した 3 施設の DPM の平均値と標準誤差である。彼らは 7 物質について報告しているが、ここでは SI で評価したときの感作性が強、中、弱であった 3 物質 (Dinitrochlorobenzene, Isoeugenol, pABA) を検討対象とした。AOO (acetone/olive oil) が、各物質に

用いられた溶媒である。

表 1 Loveless ら (1996) の報告による 3 施設の DPM の平均と標準誤差

Concentration (%)	Lab. 1		Lab. 2		Lab. 3	
	DPM		DPM		DPM	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
<i>Dinitrochlorobenzene</i>						
AOO	287	64	163	22	26	11
0.010	444	67	163	18	65	12
0.025	529	179	194	27	76	28
0.050	675	119	455	93	82	13
0.100	2550	349	2092	316	184	23
0.250	10953	493	12814	1675	639	55
<i>Isoeugenol</i>						
AOO	251	22	313	57	43	12
0.25	729	105	228	39	53	11
0.50	435	112	230	37	74	77
1.00	584	40	272	10	112	16
2.50	953	145	649	133	184	35
5.00	1718	259	2242	487	479	96
<i>pABA</i>						
AOO	90	13	139	18	59	16
0.5	101	14	223	33	67	10
1.0	98	10	116	11	37	10
2.5	104	16	121	18	39	11
5.0	100	23	91	5	46	10
10.0	86	15	97	3	35	7

表 2 に各物質、各濃度の SI と B.1. で示した式(2)、式(3)で推定した分散の値を示す。

この表より、式(3)の分散は、式(2)の分散に比べて大きくなっていることがわかる。これは、式(2)は分母である溶媒群の DPM のばらつきを考慮していないことの影響であろう。また、SI の値が大きくなると、2つの分散の乖離は大きくなっている。これは、式(2)が分母を考慮していないからではなく、式(3)で示される分散が SI の二乗に比例していることであろう。これは近似の影響であるかもしれない。

表 2 SI と分散

Concentration (%)	Lab. 1		Lab. 2		Lab. 3	
	Var(SI)		Var(SI)		Var(SI)	
	SI	式(3)	SI	式(3)	SI	式(3)
<i>Dinitrochlorobenzene</i>						
0.01	1.55	0.17	0.05	1.00	0.03	0.01
0.025	1.84	0.56	0.39	1.19	0.05	0.03
0.05	2.35	0.45	0.17	2.79	0.47	0.33
0.1	8.89	5.40	1.48	12.83	6.76	3.76
0.25	38.16	75.38	2.95	78.61	218.18	105.60
<i>Isoeugenol</i>						
0.25	2.90	0.24	0.17	0.73	0.03	0.02
0.5	1.73	0.22	0.20	0.73	0.03	0.01
1	2.33	0.07	0.03	0.87	0.03	0.00
2.5	3.80	0.44	0.33	2.07	0.32	0.18
5	6.84	1.42	1.06	7.16	4.12	2.42
<i>pABA</i>						
0.5	1.12	0.05	0.02	1.60	0.10	0.06
1	1.09	0.04	0.01	0.83	0.02	0.01
2.5	1.16	0.06	0.03	0.87	0.03	0.02
5	1.11	0.09	0.07	0.65	0.01	0.00
10	0.96	0.05	0.03	0.70	0.01	0.00

C.2. 施設間差の指標の検討

表 3 に各物質各濃度の $\exp(\tau^2)$ の値を示す。

表 3 各濃度の $\exp(\tau^2)$

Dinitrochlorobenzene		Isoeugenol		pABA	
Conc. (%)	$\exp(\tau^2)$	Conc. (%)	$\exp(\tau^2)$	Conc. (%)	$\exp(\tau^2)$
0.01	1.10	0.25	1.60	0.5	1.01
0.025	1.07	0.5	1.26	1	1.00
0.05	1.00	1	1.38	2.5	1.00
0.1	1.02	2.5	1.07	5	1.04
0.25	1.29	5	1.00	10	1.00

表 3 の中で、 $\exp(\tau^2)$ の最大値は Isoeugenol の 0.25% の 1.60 である。表 2 から 3 施設の SI (式(3) の $\text{Var}(SI)$) は、それぞれ 2.90 (0.24)、0.73 (0.03)、1.23 (0.18) であり、分散が小さい割に SI のばらつきが大きいことがわかる。Dinitrochlorobenzene の 0.25% では SI (式(3) の $\text{Var}(SI)$) は 38.16(75.38)、78.61 (128.18)、24.58 (112.59) であり、 $\exp(\tau^2)$ の値は 1.29 と 1.60 よりも小さい。SI の値のみをみると施設間のばらつきは大きいように見えるが、個々の SI のばらつきである $\text{Var}(SI)$ を考慮した場合、SI 間のばらつきは Isoeugenol の 0.25% ほどは大きくないということになる。 $\exp(\tau^2)$ は 1 より小さな値をとれない。1.00 くらいの値をとっているところでは、SI 値のばらつきはそれほど大きくなっていないことがわかる。

C.3. バリデーション研究の遂行計画

図 1 に、LLNA-DA 法バリデーション研究で行われたことに基づく研究の遂行プランを示す。

この図は、これから行うバリデーション研究を計画する場合に、いつどのようなことを行うのかを把握する上で参考になるであろう。個々のバリデーション研究において、計画時にこのようなシートを作成し、大まかな日程と責任をもつ担当を決めておくことが研究のマネジメントという観点からも、研究者間の理解の上でも役に立つであろう。

研究参加者が決まるまでの準備		
・実験手順書の案の作成		
・研究計画書の案の作成		
・研究にかかる費用の試算		
参加施設の公募～研究参加者の決定		
・参加研究者の決定		
・実験実施施設の公募と決定		
・実験条件の確認		
・スケジュールの確認		
・実験手順書案の確認		
・研究計画書案の確認		
技術研修までの準備		
・試料の準備		
・被験物質の選定		
・技術研修会の準備		
・被験物質の割付		
・実験記録用紙の作成		
・データ入力ファイルの作成		
・実験期間スケジュールの調整		
・データ解析の計画		
技術研修		
・研究計画書、実験手順書、記録用紙、データ入力ファイルの確認		
・技術研修会の実施		
・技術研修を通じて生じた疑問の確認		
予備実験までの準備		
・試料の配布		
・実験に使用する機器の準備 (校正等)		
・(予備実験用) 記録用紙の配布		
・(予備実験用) データ入力ファイルの配布		
予備実験		
・予備実験の実施		
・記録用紙への記入と提出		
・データ入力ファイルへの記入と提出		
・予備実験のデータ解析		
予備実験結果の検討		
・予備実験結果の確認		
・実験手順書の改訂に関する検討		
・本実験を行うか否かの決定		

D. 議論

ここでは、LLNA-DA 法のバリデーション研究で行った統計的検討事項および研究のマネジメントに関する事項について記載した。ひとつのバリデーション研究という点からは、前者は細部の技術的な側面であり、後者は研究全体という広範な側面となっている。両者は質が異なる内容である

かもしれないが、全体で何を行うのかの把握がなくて、具体的な統計解析の検討はできない。LLNA-DA法のバリデーション研究を始める際、主な目的が施設間再現性の評価であるということは研究者全員が認識していたが、そのための具体的なデータ解析の方法は明確ではなかった。参考になるものはLLNA法で行われてきたことであったが、多くの公表されている文献は満足いくものではなかった。特に、感作性の評価をSIで行うとされているにもかかわらず、SIそのもののばらつきについてはの検討は無視されているようであった。また、施設間差の評価に関しては定量的な評価がほとんどされていなかった。そこで、LLNA-DA法のバリデーション研究ではSIのばらつきを考慮すること、施設間差を定量的に評価することを試みた。本研究でのSIに関する統計的側面の検討はこの点に関して行われたものであり、バリデーション研究が進行とともに行った。このような検討が行うことができたのは、研究を計画した段階で何を調べたいのか、誰が何を担当しているのかが明確にしていたからである。過去に筆者が経験したバリデーション研究のいくつかは、主要な目的があいまいなものが多かった。実験手順書には実験方法が詳細に記載されても、バリデーション研究の目的に沿った検討が不十分であったように感じられる。いくつかの研究では、実験結果のデータが得られた後に、統計解析の検討をはじめなくてはならなかった。しかしこれでは、十分な検討を行うことはできないし、実験実施施設のデータが得られてからデータ解析の結果を示すまでに一定の時間が必要となってしまう。このことが問題であると考えていた筆者にとって、統計的検討のためにも、研究のマネジメントが必要であった。もちろん統計的検討のためだけにマネジメントが必要なわけではない。そのいくつかの利点は、本稿に示したとおりである。

本研究ではSIの分散についての検討を行ったが、分散の利用は、データの記述としてSIとともに示す意外に、検定を行うときに使用することが考えられる。溶媒のばらつきを無視すると、分散は小さな値となるため、検定統計量は大きめになり、陽性と判定されやすくなるであろう。もうひとつの利用法としては信頼区間の構成が考えられる。この研究で導いた式(3)による分散はSIが大きくなるほど大きくなっていった。この点は、この分散が過大評価しているかも知れず、更なる検討が必要である。式(3)に基づいて信頼区間を構成した場合、SIが大きいく所ではばらつきが非常に大きくなり、誤解を与えるかもしれない。しかしながら、LLNA法もLLNA-DA法も感作性の判定はSIの値が3を越えるかどうか基準とされており、3付近の値で極端に分散が大きくなることはないので、判定という観点からは大きな問題にはならないかもしれない。

本研究で提案する施設間差の指標 $\exp(\tau^2)$ は、SIとその分散の値があれば算出が可能である。この指標は各濃度ごとに算出されるので、個々の物質ごとの指標とはなっていない。LLNAではSIが3となる濃度を示す指標EC3で物質の特徴を要約することが行われることがあるので、EC3についてその分散を計算すれば、物質ごとに施設間再現性の指標を導くことができるであろう。もしも濃度数が多くとられていればそのようなアプローチの方が望ましいかもしれない。しかし、LLNA-DAのバリデーション研究では、各物質の濃度数は3であった。このためEC3の安定した分散を推定することは困難であると判断し、各濃度ごとの指標とした。EC3を用いることの他の困難さは、濃度反応関係が単調増加ではなくSIの値3付近で頭打ちになってしまう場合の値の決定が難しいことと、すべての濃度でSIが3を超えない場合は値を得ることができないことである。

E. 結論

ここでは、LLNA-DA 法のバリデーション研究でのデータ解析の統計的側面として SI の分散の導出と施設感差の指標の提案を行った。これにより、研究結果の定量的な評価が可能となる。本研究で示した方法論は実際に LLNA-DA 法のバリデーション研究で使用された。また、ここでは研究のマネジメントの重要性について論じた。バリデーション研究はさまざまな役割の研究者によって実施されるものである。各研究者の研究目的や役割に関する認識を共有することが必要である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Omori, T. (2006) A measure evaluating relevance of a validation study of alternatives to animal testing, *AATEX*, 12, 25-31.

学会発表

- 1) 大森崇、寒水孝司、Stimulation Index の施設間再現性を評価する指標、第 20 回日本動物実験代替法学会 (2006.12.8)
- 2) 大森崇、出原賢治、小島肇、寒水孝司、有馬和範、後藤浩彦、花田智彦、五十嵐良明、猪田健人、金澤由基子、小坂忠司、牧栄二、森本隆史、篠田伸介、篠田直樹、武吉正博、田中正志、浦谷衛、宇佐美雅仁、山中淳、米田知史、吉村功、湯浅敦子、皮膚感作性試験代替法 (LLNA-DA 法) バリデーション研究、第 20 回日本動物実験代替法学会 (2006.12.8)
- 3) 高沼正幸、寒水孝司、大森崇、浜田知久馬、吉村功、動物実験代替法バリデーション研究

における被験物質割付の最適性に関する検討、第 20 回日本動物実験代替法学会 (2006.12.8)

- 4) 兵頭洋平、寒水孝司、大森崇、浜田知久馬、吉村功、動物実験代替法のバリデーションにおける transferability の統計的評価に関する研究、第 20 回日本動物実験代替法学会 (2006.12.8)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

謝辞

本研究の遂行にあたっては、東京理科大学工学部の吉村功先生、大阪大学臨床医工学融合教育センターの寒水孝司助教授の協力を得た。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- Balls, M. and Fentem, J. H. (1999) The validation and acceptance of alternatives to animal testing, *Toxicology in Vitro*, 13, 837-846.
- Basketter, D. A., Scholes, E. W., Kimber, I., Botham, P. A., Hilton, J., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C. and Waite, S. J. (1991) Interlaboratory evaluation of the local lymph node assay with 25 chemicals and comparison with guinea pig test data. *Toxicology Methods* 1, 30-43.
- Kimber, I., Hilton, J., Botham, P. A., Basketter, D. A., Scholes, E. W., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C., Gray, T. J. B. and Waite, S. J. (1991) The murine local lymph node assay: results of an inter-laboratory trial. *Toxicology Letters* 55, 203-213.
- Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick

- G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Scholes, E. W., Ladics, G. S., Loveless, S. E., House, R. V. and Guy A. (1995) An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. *Toxicology* 103, 63-73.
- Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Lea, L., House, R. V., Ladics, G. S., Loveless, S. E. and Hastings K. (1998) Assessment of the skin sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: an interlaboratory evaluation. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 53, 563-579.
- Loveless, S. E., Ladics, G. S., Gerberick G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Scholes, E. W., House, R. V., Hilton, J., Dearman, R. J. and Kimber, I. (1996) Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial. *Toxicology* 108, 141-152.
- Normand, S. L. T. (1999) Meta-analysis: formulating, evaluating, combining, and reporting. *Statistics in Medicine* 18, 321-359.
- OECD (2002) Organization for Economic Co-operation and Development – OECD guidelines for testing of chemicals. No. 429: Skin sensitization: Local lymph node assay.
- OECD (2005) Organization for Economic Co-operation and Development – OECD series on testing and assessment. No. 34: Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment.
- Scholes, E. W., Basketter, D. A., Sarll, A. E., Kimber, I., Evans, C. D., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C. and Waite, S. J. (1992) The local lymph node assay: Results of a final inter-laboratory validation under field conditions. *Journal of Applied Toxicology* 12, 217-222.
- Yamashita K., Idehara K., Fukuda N., Yamagishi G. and Kawada N. (2005) Development of a modified local lymph node assay using ATP measurement as an endpoint. *Alternatives to Animal Testing and EXperimentation* 11, 136-144.

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
Takashi Omori	A measure evaluating relevance of a validation study of alternatives to animal testing	AATEX	12	25-31	2006