

果、どの処理群においても倍数性細胞の有意な増加や、線量依存的な倍数性細胞の誘発は見られなかった⁹⁾ (表 13, 14)。

ii) ラット

照射コムギ粉の給餌開始6週と12週後の末梢血中の小核については、何れの条件においても有意な増加は見られなかった。また、12週後のラット骨髓細胞における倍数性細胞についても非照射群との間に有意な増加は見られなかった。

本実験では動物飼料の殺菌線量レベルである30kGyを含み、7.5kGy、15kGy、30kGyの線量で照射したコムギ粉を、照射8時間後に飼料に加えて3日間ハムスターに給餌した。しかしながら、骨髓細胞において明らかな倍数性細胞の誘発は見られなかった (表 15, 16)。また、本実験と同様

に Tesh ら (1977) も、倍数性細胞と小核誘発に関して照射による影響はないことを報告¹⁰⁾している。Renner⁵⁾は、照射後3日以内に照射飼料を与えた場合、非照射群に比べて倍数性細胞が増加し、照射6週間保存した後に飼料を与えた場合にはその影響がないことを報告している。このことは、照射によってラジカルが生成され、倍数性細胞を誘発するような成分の変化をきたしている可能性が示唆された。そこで本実験では、ガンマ線照射によるH₂O₂その他の活性酸素種の生成を抑える目的で、照射時のコムギ粉中の空気を窒素に置換した群と置換しない群を設けて実験を行った。しかしながら、何れの条件下においても倍数性細胞の生成に顕著な差は見られず、倍数性細胞に影響を及ぼすような変化はみられなかった。

表 13. 照射コムギ粉の経口投与によるチャイニーズ・ハムスター末梢血での小核誘発

照射線量(kGy)	給餌期間 (hrs)	動物数	分析細胞数	小核を有する細胞	%
非照射	48	6	6000	8	0.13
	72	—	6000	21	0.35
7.5 in N ₂	48	6	6000	14	0.23
	72	—	6000	15	0.25
15 in N ₂	48	6	6000	14	0.23
	72	—	6000	15	0.25
30 in N ₂	48	6	6000	14	0.23
	72	—	6000	15	0.25
7.5 in air	48	6	6000	14	0.23
	72	—	6000	15	0.25
15 in air	48	6	6000	14	0.23
	72	—	6000	15	0.25
30 in air	48	6	6000	14	0.23
	72	—	6000	15	0.25

表 14. 照射コムギ粉の経口投与によるチャイニーズ・ハムスター骨髓細胞でのポリプロイド誘発

照射線量(kGy)	給餌期間 (hrs)	動物数	分析細胞数	小核を有する細胞	%
非照射	72	6	13200	10	0.076
7.5 in N ₂	72	6	13200	5	0.038
15 in N ₂	72	6	13200	20	0.152
30 in N ₂	72	6	13200	21	0.159
7.5 in air	72	6	13200	7	0.053
15 in air	72	6	13200	24	0.182
30 in air	72	6	13200	20	0.152

表 15. 照射コムギ粉の経口投与によるラット末梢血中の小核誘発

照射線量(kGy)	給餌期間(週)	動物数	分析細胞数	小核を有する細胞	%
0.00	6	9	9000	10	0.11
0.75	6	8	8000	10	0.13
0.00	12	9	9000	14	0.16
0.75	12	8	8000	5	0.06

表 16. 照射コムギ粉の経口投与によるラット骨髓細胞でのポリプロイド誘発

照射線量(kGy)	給餌期間(週)	動物数	分析細胞数	小核を有する細胞	%
0.00	12	9	10800	5	0.05
0.75	12	8	9479	9	0.09

表 17. TA98, TA100, TA102 株におけるガンマ線照射クロコショウ 50%エタノール抽出物の変異原性誘発

抽出物量 (μ L/plate)	S9	TA98			TA100			TA102		
		0 kGy	1 kGy	10 kGy	0 kGy	1 kGy	10 kGy	0 kGy	1 kGy	10 kGy
0	—	21	26	26	121	129	128	316	256	256
5	—	20	19	19	145	81	85	181	150	115
10	—	11	20	20	142	100	93	168	142	84
20	—	11	20	20	103	102	94	79*	63*	40
50	—	16	23	23	121	101	77	30*	7*	5
100	—	12	26	36	120*	82*	67*	4*	0*	0
0	+	20	29	29	137	98	98	358	273	273
5	+	47	55	58	119	124	121	326	252	220
10	+	68	48	54	128	116	115	304	215	194
20	+	69	46	49	107	95	124	251	176	125*
50	+	19	43	33	114	97	109	71*	32*	26*
100	+	11	25	20	105	106	102	18*	0*	0*

*: 生育障害がみられた

Vijayalaxmi ら²⁾は、0.75kGyの放射線を照射したコムギを含む飼料をマウス、ラット、サルなどに長期間与えると倍数性細胞を誘発するという報告をしている。そこで本実験では、ラットに12週間給餌し、骨髓細胞の倍数性細胞誘発と、末梢赤血球中の小核誘発を調べた。その結果、12週後のラット骨髓でも倍数性細胞の誘発は見られず、6週後と12週後に調べた末梢赤血球の小核についても有意な増加は認められなかった(表16)。

以上の結果より、前述の原子力特定総合研究で実施した照射コムギの遺伝毒性試験結果がすべて陰性である事も考慮し、国外で報告されている初期の陽

性結果^{2),3),5),6)}については再現性が得られず、照射コムギ粉による遺伝毒性作用はないものとする。

(8) 照射スパイスの変異原性

黒コショウでは、エタノール抽出物と超臨界流体抽出による抽出法の違いによる変異原性の比較をしたところ、いずれの抽出物でもTA98においてのみ代謝活性化法で照射、非照射ともに弱い変異コロニー数の増加が認められたが、照射によって増加することはなく(表17)、また抽出法による差も認められなかった。赤トウガラシでは、非照射のTA98の代謝活性化法において、対照の2倍程度の変異コロニー数増加が認められたが、照射群については変

表 18. TA98, TA100, TA102 株におけるガンマ線照射クロコシヨウの SFE (超臨界流体抽出物) による変異原性誘発

抽出物量 (μ L/plate)	S9	TA98			TA100			TA102		
		0 kGy	1 kGy	10 kGy	0 kGy	1 kGy	10 kGy	0 kGy	1 kGy	10 kGy
0	—	24	24	24	148	148	148	395	395	395
0.01	—	23	14	28	117	104	112	344	304	292
0.03	—	22	17	30	129	108	113	389	320	317
0.1	—	23	15	24	115	123	97	389	357	315
0.3	—	25	19	20	123	115	115	351	345	335
1	—	23	15	28	122	122	122	313	312	339
3	—	13	10*	16*	51*	46*	89*	253	207	301
0	+	29	29	29	145	145	145	406	406	406
0.1	+	26	33	29	112	123	105	369	351	344
0.3	+	42	35	32	114	110	117	382	365	400
1	+	59	54	59	117	121	125	437	422	433
3	+	52	58	60	110	136	118	477	356	390
10	+	37	45	40	110	143	137	293	291	408
30	+	26*	51*	26*	93	85	79	208	215	330

*: 生育阻害がみられた。

表 19. TA98, TA100, TA102 株におけるガンマ線照射赤トウガラシの SFE (超臨界流体抽出物) による変異原性誘発

抽出物量 (μ L/plate)	S9	TA98			TA100			TA102		
		0 kGy	1 kGy	10 kGy	0 kGy	1 kGy	10 kGy	0 kGy	1 kGy	10 kGy
0	—	24	24	24	148	148	148	395	395	395
0.01	—	26	24	24	146	138	155	402	413	401
0.03	—	30	27	26	136	135	152	398	389	351
0.1	—	25	23	24	147	134	135	365	423	349
0.3	—	21	30	27	163	125	129	411	451	368
1	—	17	24	22	158	148	139	357	435	322
3	—	23	26	19	56*	86*	73	123*	106	127*
0	+	32	32	32	145	145	145	406	406	406
0.1	+	40	47	46	129	117	138	396	424	394
0.3	+	32	42	43	159	126	125	361	376	394
1	+	38	35	41	174	138	130	397	432	369
3	+	53	39	44	172	140	144	381	433	381
10	+	64	53	45	172	158	165	397	504	459
30	+	15*	20*	19*	73*	85*	56*	353*	368*	331*

*: 生育阻害がみられた。

異コロニーの増加は認められなかった(表18, 19)。ナツメグ, パプリカについては, 照射, 非照射のいずれの抽出物も全ての用量で変異コロニーの増加は認められなかった。黒コショウと赤トウガラシの弱い変異コロニー誘発については, コショウはコウジカビが産生するアフラトキシンで汚染される事があることから, 今回の抽出物に関して, アフラトキシンの存在を薄層クロマトグラフィーにより確認したがその存在を示すことはできなかった。このことから, 弱い変異コロニーの誘発はコショウ成分中の物質によるものと考えられた¹⁴⁾。

スパイスは亜熱帯で生産される為, 微生物や真菌, 及び真菌の代謝産物であるマイコトキシンによる汚染を受けやすく, 食品衛生上何らかの方法により殺菌する必要がある。これまでその微生物汚染を軽減する為, 臭化メチル, EOガスや短時間の高温殺菌が行われてきた。しかし, 臭化メチルは毒性が強く, オゾン層破壊物質で2005年には撤廃される予定であり, 一方, EOガスは強い遺伝毒性物質であることから適切とはいえない。香辛料としての特性を失うことなく殺菌する方法として, 放射線照射による殺菌が最も有効とされ, 照射食品の中でもスパイスの照射が多くの国々で採用されている。したがって, 食物の大部分を海外からの輸入に頼っているわが国では, 我々の知らないうちに食している可能性も否定できないことから, 検知法による識別も重要となる。スパイスは種類も多く, そのものの生理作用については多くの報告がある一方で, 照射スパイスの安全性に関する報告は少ない。本研究では細菌を用いる復帰変異試験のデータを示したが, 培養細胞や動物を用いた遺伝毒性試験は未だ行われておらず, リスク評価の観点から, 各種の試験系のデータが必要とされる食品である。

おわりに

本項では, 秦野研究所で実施した照射食品の遺伝毒性に関するデータをまとめ, 網羅的に概説した。投与量としてはかなり過酷な試験条件にもかかわらず, 試験した照射食品の全てに陰性の結果が得られ, 問題となるような点はみられなかったことから, 本試験条件下では, 照射食品の遺伝毒性はないものと考ええる。

我々が普段から食している自然食品や天然添加物

においても遺伝毒性を示す食品は数多くある。魚や肉の焼け焦げで知られるごとく加熱調理することで強烈な発がん物質が生成されることも分かってきたが, その後の研究により同時に野菜類を食べることで遺伝毒性作用が軽減・消失する事や, 我々自身がその部分を食べない事でその毒作用を回避するようになってきた。食品照射は食品保存や食品衛生の面から極めて効果的であり, 用いられる実用的な照射線量では, 食感が損なわれず栄養成分の変化も少ないなどのメリットがあることから, 多くの国で食品に照射されている。一方高線量では, グルコースのように特定の栄養成分の変化によって変異原性物質が生じ, それはまた果実中の成分で不活化される例も知られている¹²⁻¹⁶⁾。このように, 照射によって起こりうる可能性のある未知の成分変化や生成物に対する生物作用に関しては, バイオアッセイによって照射線量の毒性学的な安全域を確認し, 消費者が安心して食べられるような科学的なデータを提供する事が重要である。

謝 辞

照射食品の健全性/安全性評価について早くからその重要性を唱えられ, 本研究にご助言下さった松山晃博士に深く感謝申し上げます。なお本稿は, 秦野研究所遺伝毒性部門の礎を作られこの研究の指揮をとられた(故)岩原繁雄博士と, 現在は数名のメンバーしか秦野研究所に在籍していないが, 当時先輩同僚として一緒に研究を行った, 渋谷徹博士, 高鳥浩介博士, 室田哲郎博士, 加藤基恵博士, 山影康次博士, 坂本(荒川)京子, 金指(川上)久美子の各氏にささげたい。

文 献

- 1) 岩原繁雄: 秦野研究所で実施された照射食品の遺伝毒性試験, 秦野研究所年報, 6, 77-88(1983).
- 2) Vijayalaxmi and G. Sadasivan: *Int. J. Radiat. Biol.*, 27, 135-142 (1975).
- 3) Vijayalaxmi and S. G. Srikantia: *India. Radiat. Phys. Chem.*, 34, 941-952 (1989).
- 4) V. A. Kopylov et al.: *Radiobiologia*, 12, 524 (1972).
- 5) H. W. Renner: *Toxicology*, 8, 213-222 (1977).
- 6) C. Bhaskaram and G. Sadasivan: *Am. J. Clin. Nutr.*, 28, 130-135 (1975).

- 7) 林真：「小核試験」—実験法からデータの評価まで—, サイエнтиスト社 (1991).
- 8) H. V. Levinsky and M. A. Wilson: *Food Cosmet. Toxicol.*, **13**, 243 (1975).
- 9) J. M. Tesh et al.: Studies in rats fed a diet incorporating irradiated wheat, International project in the field of food irradiation, pp.1-64, Technical report series IFIP-R 45, October (1977).
- 10) 田中憲穂：照射コムギ粉飼料給餌によるチャイニーズ・ハムスターおよびラット骨髄細胞に置ける倍数性細胞の誘発と末梢赤血球中の小核誘発, 食品照射委員会・研究成果最終報告書, 日本アイソトープ協会, 212-219 (1992).
- 11) 坂本京子：ガンマ線照射スパイス・マンゴーの変異原性, 食品照射委員会・研究成果最終報告書, 日本アイソトープ協会, 205-211 (1992).
- 12) 川岸舜朗：ガンマ線照射糖液の変異原性およびその抑制, 食品照射委員会・研究成果中間報告書, 日本アイソトープ協会, 119-130 (1989).
- 13) 祖父尼俊雄, 石館基：照射グルコースのチャイニーズ・ハムスター細胞による染色体異常試験, 食品照射委員会・研究成果中間報告書, 日本アイソトープ協会, 131-146 (1989).
- 14) 坂本京子, 岩原繁雄：照射食品および照射グルコースのサルモネラを用いる変異原性試験, 食品照射委員会・研究成果中間報告書, 日本アイソトープ協会, 147-162 (1989).
- 15) 祖父尼俊雄, 石館基：ガンマ線照射グルコースについての変異原性試験, 食品照射委員会・研究成果最終報告書, 日本アイソトープ協会, 150-181 (1992).
- 16) 坂本京子, 岩原繁雄：ガンマ線照射グルコースの変異原性, 食品照射委員会・研究成果最終報告書, 日本アイソトープ協会, 182-191 (1992).

(2004年8月9日受理)

動物実験代替法の国際動向とハーモナイゼーション

日本化粧品工業連合会

豊田 英一

Abstract : The most recent and international movement regarding to the alternative methods to animal testing is the 7th amendment of EU Cosmetic Directive. By this Directive, testing ban and marketing ban enter into a phased prohibition in consideration of scientific progress. However, the development of the alternative method that has been left is extremely difficult compared with the one that has been developed so far. A global collaboration is necessary now for accomplishment of the goal.

Key words : alternative methods to animal testing, international activities, EU Cosmetic Directive, 7th amendment

1. はじめに

動物実験代替法の国際動向をまとめるにあたってのキーポイントは、何といてもEUの動向である。

動物実験反対の動きが強まるなかEUは、1993年6月14日、化粧品指令を満たすために行う動物試験を全面的に一括禁止しようとするEU化粧品指令第6次改正¹⁾を交付する。すなわち、動物を用いて安全性試験を実施した原料または原料混合物を配合した化粧品の販売を1998年1月1日以降禁止するという、いわゆるmarketing banである。この法律は、代替法開発の現状と可能性・期間を考慮しない非現実的な全面禁止であったため、期限を迎えるころになっても代替法は確

立されず、消費者保護の観点からか2度の延期が決定され、最終的には2002年6月30日を期限とすることとなった。

この期限を目前に欧州議会と閣僚理事会では、現実的な対応を盛り込んだ修正案の検討がなされ、1st reading, 2nd reading, 調停会議を経て期限を過ぎた2003年3月11日、EU化粧品指令第7次改正²⁾が公布された。改正指令によって、動物実験は科学的な妥当性を考慮した段階的な廃止へと向かうことになった。この法律は、言うまでもなく消費者の安全性確保と動物愛護の両立を目指そうとするものであるが、現在の科学的進歩を考慮してもなお到達するのが難しい達成目標と達成時期を明確にすることによって、関係者に一段の努力を迫った法律であるとも言えそうである。

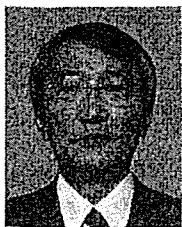
本稿では、このEU化粧品指令第7次改正の内容について詳述することを中心にとまとめてみたい。なお、本稿で用いる略称は、関連機関をまとめた表1に記載されている。

2. EU化粧品指令第7次改正 (DIRECTIVE 2003/15/EC)

本指令は、上述のごとく2003年3月11日に公

“International activity and harmonization in alternative methods to animal testing.”

Hidekazu Toyoda (Shiseido Research Center, Shiseido Co. Ltd., 株式会社資生堂安全性・分析センター—224-8558 横浜市都筑区早淵2-2-1)



1946年3月埼玉大学理工学部化学科卒業、同年4月資生堂化学研究所入社、2000年12月安全性研究所長、2002年6月安全性・分析センター長、現在に至る。日本化粧品工業連合会・安全性部会長

表1 動物実験代替法研究開発に関連する官庁、研究機関一覧

略称	正式名称	関連機能概略	ホームページ
EU Comm.	European Commission	EU委員会, 化粧品指令の改定	http://europa.eu.int/comm/
DG Enterprise	Directive General Enterprise (Unit F3 ; ———, Cosmetics)	EU委員会で化粧品業界の法規制実担当部門, 7次改正下では「代替法開発スケジュール」[Annex IX]を担当	http://pharmacos.eudra.org/F3/home.html
SCCNFP	Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers	EU委員会への科学諮問機関, 代替法・化粧品の安全性に関するOpinionの発表等を担当, 2004年SCCP (Scientific Committee on Consumer Products) に再編成されている	http://europa.eu.int/comm/health/ph_risk/committees/(04_)sccp/(04_)sccp_en.html ()内はSCCP
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods	1991年設立, EUの代替法バリデーションセンター, バリデーションと公的認知活動の推進を担当	http://ecvam.jrc.cec.eu.int/index.htm
COLIPA	The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association	欧州化粧品工業会	http://www.colipa.com/
SCAAT	The COLIPA Steering Committee on Alternatives to Animal Testing	COLIPAのプロジェクトチームの一つで「動物実験代替法研究開発運営委員会」	
ICCVAM	The Interagency Coordinating Committee for the Evaluation of Alternative Methods	1994年設立, 米国動物実験代替法関連官庁調整委員会, バリデーションとハーモナイゼーション	http://iccvam.niehs.nih.gov/
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development (Environment Directorate)	化学物質の国際的な試験法ガイドラインの審議・制定	http://www.oecd.org/department/0,2688,en_2649_34377_1_1_1_1_1_0.html
JaCVAM (仮)	Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (仮)	新設を目指している「日本動物実験代替法バリデーションセンター」	

布された。指令そのものでわかることと、加盟各国およびEU委員会に課した2004年9月11日期限の宿題となっていることがあるので、それらを項分けして述べていきたい。

2-1. 指令を逐条的に要約する

①加盟各国における以下の化粧品の販売禁止 (Marketing Ban)

- a) OECDのバリデーションの進展を考慮した上でEU共同体レベルでバリデートされ採択された代替法がある場合に、その方法以外の動物試験を実施した最終処方を用いた化粧品
- b) OECDのバリデーションの進展を考慮した上でEU共同体レベルでバリデートされ採択された代替法がある場合に、その方法以外の動物試験を実施した原料または原料の組み合わせを含む化粧品

(a, bとも現時点で対象となる試験法は、光毒性と経皮吸収性試験)

②加盟各国におけるEU域内の動物試験禁止 (Testing Ban)

- a) 本規制の要求を満たすために行う最終化粧品の動物試験
- b) 危険物指令 Annex Vまたは化粧品指令 Annex IXにリストされた試験法に置換することが要求された日以降に、本規制を満たすために行う原料または原料の組み合わせに対する動物試験

(現時点で対象となる試験法は、光毒性・皮膚腐食性・経皮吸収性試験)

③EU委員会は、SCCNFPと協議した上で2004年9月11日までにAnnex IXの内容を確立する。

④EU委員会は、OECDのバリデーションの進展を考慮した上で、SCCNFPおよびECVAMと協

議して、「①Marketing Ban」および「②b原料などのTesting Ban」を満たすための予測タイムテーブルを、各種試験の廃止に関する最終期限を含めて立案する。このタイムテーブルは2004年9月11日までに公表され、欧州議会と閣僚理事会に送付される。この実行期限は、EU化粧品指令第7次改正の発効後6年を限度とする。

- ⑤現時点で考えられる代替法がない反復投与毒性試験、生殖毒性試験、毒物動態試験についての「①Marketing Ban」の実行期限は、EU化粧品指令第7次改正の発効後10年を限度とする。
- ⑥上記⑤に関して、EU委員会は⑤に規定する試験の禁止を満たすための技術的困難性を検討し、年次報告書にまとめる。この年次報告書で、技術的理由で開発されていないかバリデートされていないために⑤の期限が守れないとされた場合は、最終期限の少なくとも2年前に欧州議会と閣僚理事会に報告し、議案を提出する。
- ⑦加盟各国は、2004年9月11日までにこの規制

に従うために必要な法的規制を施行し、EU委員会に報告する。

以上、逐条的にまとめたが、それゆえにわかりにくいと思われる。時間軸でまとめ直したものを図1に示す。

2-2. EU委員会の宿題について

2-2-1. Annex IX (認証された動物実験代替法リスト)

EU委員会は、2004年9月17日にAnnex IXの内容を公表した³⁾。これによると、「当Annexは、ECVAMによって認証された代替法で、化粧品指令の要件を満たすことができ、かつ、「危険物質の分類・包装・表示に関する法律・規制・行政規定の近似化に関する欧州閣僚理事会指令67/548/EEC (=危険物質指令)」のAnnex Vに記載されていないものを収載する。動物実験は代替法によって完全に代替されえないこともあるため、Annex IXには当該代替法が動物実験に完全に取って代わるものか、あるいは部分的な代替かを記さなければならない。」とされている。

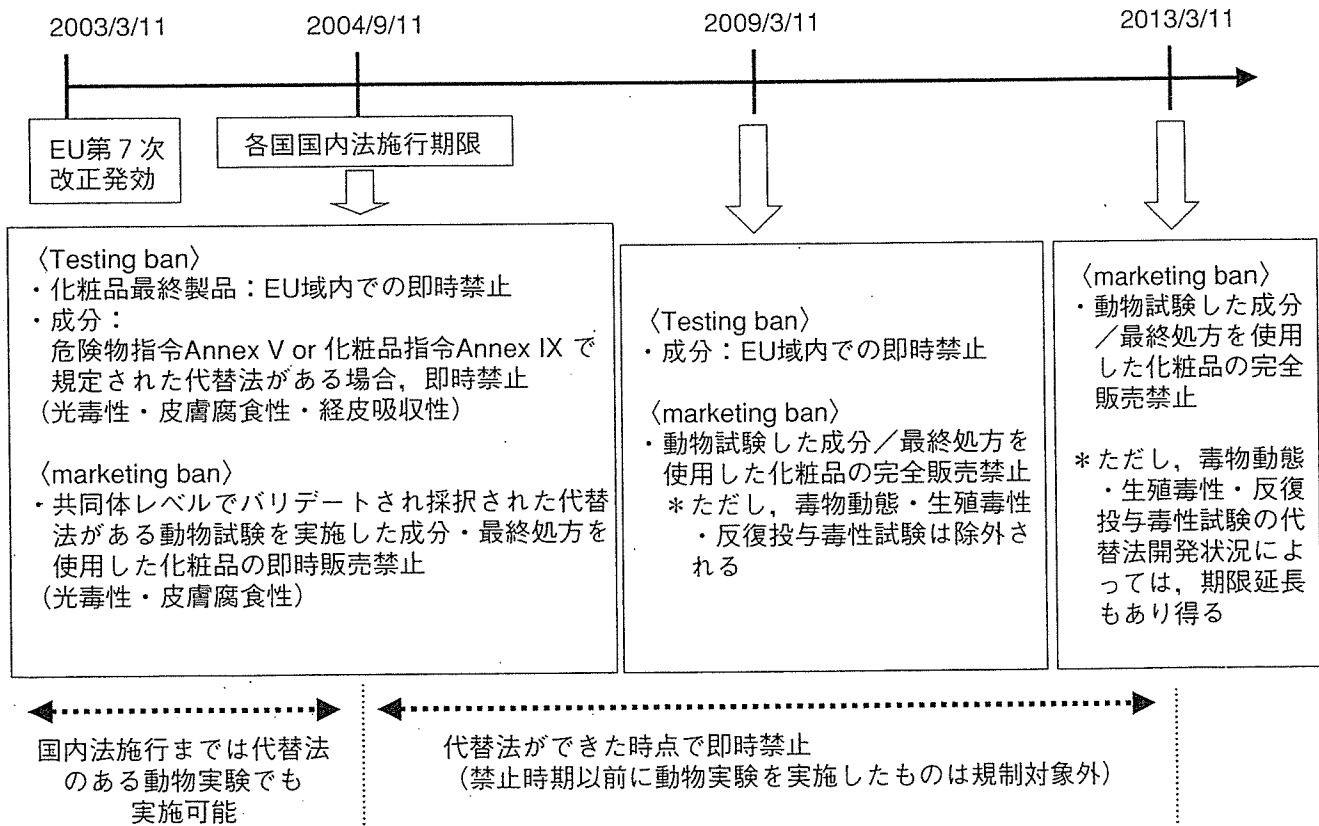


図1 EU化粧品指令第7次改正の時系列まとめ

Annex IXの内容の公表によって、化学品全般を扱う危険物質指令のAnnex Vとは別に、化粧品の安全性評価には適しているとして採用する代替法があり得ること、および代替法はひとつできればそれで動物試験は廃止できるというものではなく、部分置換しかできない試験法がある（が多い）ことが明確になった点で、大きな進歩と言えよう。

日本の厚生科学研究班がバリデートし、マイルドな毒性物質の評価は可能と結論している眼刺激性試験代替法は、まさにこのAnnex IXの部分置換法に該当すると考えられる。

2-2-2. 各種試験の確立予測に関するタイムテーブル

EU委員会は、2004年10月4日に上記タイムテーブルを公表した⁴⁾。このタイムテーブルによれば、第7次改正化粧品指令におけるMarketing Banのデッドラインが2009年とされていたものの多くは目標達成見込みとされているが、「急性毒性試験」「遺伝毒性・変異原性試験」については部分置換も含めて予想を立てられないとされている。また、デッドラインが2013年とされていたもの全てについても同様に予想を立てられないとされている。このタイムテーブルは、ステークホルダーの合意に基づくものであり、内容については納得できるものである。

このタイムテーブルが出たからといって、一部は指令に反した予測でもあり、そのまま認められるとは限らない。当然のことながらEU域内の関係研究者、特にCOLIPA/SCAATに所属するメンバーは、指令に定めた目標に向かって、多額のファンドを集め、研究者を集めて代替法の研究開発に多大な貢献をし続けている。筆者もCOLIPA/SCAATのメンバーとして名を連ねているが、いまだ貢献らしいこともできずにいる。彼らの努力が結実することを強く願うとともに、日本においても研究開発に邁進し日本発の代替法OECDガイドラインをひとつでも多く持てるよう努力することが、ハーモナイゼーションの第一歩となると確信している。

2-3. 国内法規などの整備という宿題を課せら

れた加盟各国の整備状況について

化粧品にかかわる法規は各国まちまちで、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。そのためか、整備状況は遅れている模様であるが、詳細はつかみきれていない。新たにEUに加わった東欧諸国の整備はおおむね期限内に終了したと報告されているが、ドイツ、フランスなど主要国が終了したとの情報は得ていない。その点では、今年が規制元年ということになりそうである。

2-4. 条項間でいくつかの相違点や解釈の難しい表現がある

以下に私見として考察してみる。

1) 「EU化粧品指令を満たすために行う試験」という表現

ひとつの原料について考えた場合、用途としてまず化学品が想定され、その後に化粧品分野でも使用できることがわかることもあろう。この場合、化学品に要求される安全性試験が動物を用いた試験であった場合、後の化粧品への利用に影響してくるが、これはEU化粧品指令を満たすために行った試験ではないので該当しないと考えるもおかしくないとする余地が残されているように思う。

他の事例として、日本国内の医薬部外品薬事申請のために行った動物試験は、EU化粧品指令を満たすために行った試験ではないので、同じく該当しないとイえる余地を残しているように思う。貿易摩擦なども考慮された微妙な表現と解釈したい。

2) 「Marketing BanとTesting Banでは期限の根拠となる代替法の採用母体が異なっている」事実

Testing Banは、規制の根拠とする代替法を危険物指令Annex Vまたは化粧品指令Annex IX収載にしている。現時点で危険物指令Annex Vに収載されている代替法を見ると、OECDガイドラインではあるがEU共同体レベルではまだ採択されていない代替法が存在することから、Marketing Banの根拠となる「OECDのバリデーションの進展を考慮した上でEU共同体レベルでバリデートされ採択された代替法」の方が、動物試験禁止の期限としては遅くなる可能性がある。

現時点では、経皮吸収性試験がこれに該当する。

Marketing Banはより慎重にという配慮がなされた結果だとすれば、法律策定の奥深さを感じる。

3)「Marketing Banは、開発が難しいとされる代替法に関する期限を10年後とし、さらに延長の含みを持たせているが、Testing Banは2009年3月11日の時点で代替法が採択されていなくても開始される」という事実

採択された代替法がなく、動物試験も禁止されるわけだが、だからといって反復投与毒性試験、生殖毒性試験、毒物動態試験を実施しなくても良いことにはならない。したがって、新規化粧品原料などはEU域外で動物試験をして安全性を担保することになろう。動物試験の早期廃止を強く求める欧州議会の圧力と現実経済を考慮しなければならない閣僚理事会の妥協の産物ではあろうが、EU域外での動物試験実施でTesting Banを逃れることを見込め法律だとしたらひどい話である。この件については、7次改正することによって6次改正指令を粘り腰で退けたEU諸国の頑張り期待したいところである。

3. ハーモナイゼーション

編集子からいただいたテーマは、「動物実験代

替法の国際動向とハーモナイゼーション」であったので、本項では「ハーモナイゼーション」について考察してみたい。

表2に化粧品などで用いられる安全性試験項目と代替法の開発状況を示した。この表から明らかなように、現時点で利用可能な代替法は「眼刺激性試験（日本厚生科学研究班法）」、「光毒性試験法（OECD TG432）」、「皮膚腐食性試験（TG430案：TER）」、「皮膚腐食性試験（TG431：ヒト皮膚モデル）」および「*in vitro*経皮吸収試験TG427, TG428」⁵⁾だけである。換言すると、化粧品などの安全性担保に必要な他の試験、例えば「感作性試験」や「光感作性試験」などはいまだ研究開発段階にあり、試験法の確立に向けて開発を急がなければならない状況にある。

そもそもハーモナイゼーションとは、ひとつの試験分野またはひとつの試験法に関して、各地でそれぞれが行っている試験法やある試験法の詳細などを統一したほうがグローバルな比較や理解がしやすいので、その必要が生じてきた際に行われる国際的な行為と思うが、代替法に関しては対象とする試験法そのものの多くがいまだ提案されていない状況にあり、喫緊の課題は試験法の開発と提案であってハーモナイゼーションではない。

一方、代替法の開発ステップは、①生体反応の

表2 化粧品等で用いられる安全性試験項目と代替法開発状況

	安全性試験項目	化粧品	化・PL収載申請 医薬部外品申請	代替法の 開発状況
1	単回投与毒性試験	※	※※	△
2	皮膚一次刺激性試験	※	※※	△
3	光毒性試験	※	※※	◎
4	眼刺激性試験	※	※※	○
5	感作性試験	※	※※	×
6	光感作性試験	※	※※	×
7	連続皮膚刺激性試験	※	※※	×
8	変異原性試験	※	※※	×
9	ヒトパッチテスト	※	※※	—
10	反復投与毒性試験	※	※※	×
11	生殖発生毒性試験	※	※※	×
12	吸収・分布・代謝・排泄	※	※※	×
13	皮膚腐食性試験	※	—	◎
14	経皮吸収試験	※	—	◎

※：企業責任で保証，※※：申請書に試料添付が必要
◎：OECDガイドライン有，○：日本の厚生科学研究班でバリデート済
△：ICCVAM and/or ECVAMで検討中

発現機構の解析：基礎情報の収集，②生体反応の再構築：モデル試験法の作成，③開発施設におけるモデル試験法の評価，④試験法の公的なバリデーション（小規模→大規模）⑤公的なガイドライン化（OECD TG化）となっている。すなわち，試験方法の確立の段階において多施設における再現性確認や試験法の信頼性確認というバリデーション行為と，国際的意見を聴取した上で最終ガイドライン化（OECD TG化）がなされる行為が含まれており，試験法制定の段階で初歩的なハーモナイゼーションはなされているともいえそうである。

試験法の開発段階におけるコラボレーションもハーモナイゼーションの一種とみなせるが，このコラボレーションもなかなか難しい。去る1月11～12日に，アメリカはもとより日本，ヨーロッパからも専門家が集まってICCVAMの眼刺激性試験に関するエキスパートパネルミーティングが行われた。ここでは4つの試験法（BCOP，IRE，ICE，HET-CAM）に関する評価がなされたが，この会議の成果に関して，主催国のアメリカとヨーロッパ・日本の評価は異なっている。ICCVAMの眼刺激性評価に関する方向性は強刺激物質の評価にあるが，日欧は化粧品に用いられるマイルドな物質の評価に適した方法の開発に主眼をおいている。したがって，評価の対象となった4つの方法に関しても，日欧にとってはなぜ組上にあげたかから疑問が生じる。COLIPA/SCAATにとっては，ヨーロッパで多用される

HET-CAMは重要だが，IREやICEはどう結論されても痛痒を感じない。COLIPA/SCAATの眼刺激試験法開発は，Cell cultureとHuman cornea cultureに絞っているので，そちらの開発にこそ力を注ぎたい意向がある。また日本においては，上述したように厚生科学研究班においてすでに「細胞毒性試験を用いる眼刺激試験代替法」が有用と結論しており，欧米がなぜ本法を検証しないか疑問を感じているところである。

ICCVAM-ECVAMは基本的にコラボレーション，相互認証の方向性を明らかにしているが，試験法のユーザーレベルでは，単なるコラボレーションでは満足できないそれぞれの地域特性があり，コラボレーション・ハーモナイゼーションはそう簡単なものではないようである。

代替法が提案されていない試験分野では，各企業ベースの研究が進んでいると思われるが，企業ごとにアプローチも異なり，自社開発の方法を国際的に認知させたい意向がある。また，毒性評価，安全性評価はひとつの代替法で*in vivo*試験を置き換えられるほど容易なものではなく，その意味でも多様なアプローチが必要とされているため，この動きには意味があると考えられる。

これらのことを考えるとき，代替法の分野においては，今は試験法の萌芽期であり，多様な試験法の提案こそ求められているが，多数存在してどれを用いるのが最適かを調整するいわゆるハーモナイゼーションの時期ではないと言えそうである。

- サンスフェア H.Lシリーズ
- サンスフェア NPシリーズ
- サンラブリー C
- サンラブリー TZ-824

発売元 旭硝子株式会社
製造元 洞海化学工業株式会社

真球・多孔質無水ケイ酸

真球・無孔質無水ケイ酸

鱗片状・機能性フィラーシリカ

微粒子TiO₂・ZnO₂担持鱗片状フィラーシリカ

IWASE
COSFA
<http://www.cosfa.co.jp>

代理店 岩瀬コスファ株式会社

大阪：Tel.06-6231-3456 東京：Tel.03-6202-2345

4. 今後の課題

これまでにEU化粧品指令第7次改正の内容とハーモナイゼーションに関する私見を述べてきたが、COLIPA/SCAATのメンバーとして会合に参加して感じるのは、COLIPA/SCAATのアクティビティの高さや資金的援助の豊富さと、それに比べて日本の研究体制、評価機関の整備、資金援助などの圧倒的な不足である。

欧米においては、行政認知の評価機関(ECVAM, ICCVAM)が存在しガイドライン化へ直接結びつく体制がとられているが、日本においては、行政認知の代替法評価機関がなく、厚生労働科学研究班が代替法の開発、評価研究と海外情報の調査解析を行っているに留まり、その研究成果はガイドライン作成などの行政的な採り上げまでには至っていない。動物実験代替法の開発と利用の促進を図るためには、日本においても、ECVAMやICCVAMに匹敵する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。最近、その動きがあることが報じられていることを素直に喜びたい。

また、代替法の開発状況を概観すると、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、これらの代替法の開

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。

参考文献

- 1) COUNCIL DIRECTIVE 93/35/EEC of 14 Jun 1993 amending for the sixth time Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products; *Official J. European Comm.*, L151/32 (1993)
- 2) DIRECTIVE 2003/15/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 27 February 2003, amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products; *Official J. European Union*, L66/26 (2003)
- 3) COMMISSION DIRECTIVE 2004/94/EC of 15 September 2004 amending Council Directive 76/768/EEC as regards Annex IX; *Official J. European Union*, L294/28 (2004)
- 4) COMMISSION STAFF WORKING DOCUMENT; Timetables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC); *EN, SEC (2004) 1210* (2004)
- 5) OECD Environment, Health & Safety News; No.16 (2004)

● アルゲコロイド
● チトカタライザー
● ビオセラミド CH
● ビオサッカライド GY
● デュルセミン LS

総代理店 山川貿易株式会社

海藻抽出精製エキス

除蛋白無臭酵母抽出エキス

角質細胞間脂質

ムール貝ポリサッカライド

アルモンド種子由来グリコプロテイン

IWASE
COSFA
<http://www.cosfa.co.jp>

代理店

岩瀬コスファ株式会社

大阪: Tel.06-6231-3456 東京: Tel.03-6202-2345

〈シンポジウム〉

(香粧品の安全性・環境のリスクアセスメントの現状と課題)

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

豊田 英一*

Global Currents and Problems Concerning the Risk Assessment for Cosmetics

Hidekazu TOYODA*

Abstract

The safety evaluation methods for the cosmetics products has been established, therefore there is no serious problem in the market now. The global currents about the safety evaluation methods of special mention is the Seventh Amendment of EU Cosmetics Directive that provides the animal experiments prohibitions (animal testing ban) and also the sales prohibition of the product that is containing the ingredients which is evaluated by using the animal (marketing ban). We have only two alternative methods in the current state, that is the eye irritation test (in only Japan) and the photo-toxicity test, therefore development of a lot of other testing methods is a matter of great urgency. They have the official body (ICCVAM or ECVAM) for the alternative method development in USA and EU, and they validate and evaluate the alternative methods, and then adapt to the guideline. An establishment of a similar official body is hoped early in our country.

Key words: safety assessment, cosmetics, global currents, 7th amendment, alternative methods.

1. はじめに

香粧品企業は、消費者により有用で、より安全性の高い商品を提供することが使命である。香粧品の安全性の担保は、使用する原料の安全性を担保することに始まる。新規原料の安全性は、CIR (Cosmetic Ingredient Review), NTP (National Toxicology Program), IARC (International Agency for Research on Cancer) 等の公的機関の評価で不安要因がないこと、自社保有の既存データや定量的構造活性相関 (Q-SAR) から安全性の懸念がないことを確認し、ついで動物を用いた試験や代替法 (*in vitro* 法) による試験を実施してヒトに対する安全性を予測する。ヒトに用いても問題が少ないと判断できた場合、ヒト試験を実施して上市したさいの安全性を予測する。これら一連の安全性評価の結果、問題が少ないと判断された場合に上市されるが、この段階ではまだ安全であることを予測したにすぎない。その後の市場での副作用情報を把握分析し、問題が少

ないことを確認して初めて安全な商品となる (Fig. 1)。

世の中に「絶対に安全な物質 (モノ)」あるいは「100%安全な物質 (モノ)」は存在しない。有害でない使い方、安全に使える条件 (量・濃度、使用頻度、等) があるだけである。安全とはそういうことである。いかに有用なモノであっても、安全に使える量、濃度内で有用性が確保できなければ、香粧品として市場に提供すべきではない。

香粧品のリスクアセスメントは、まず動物, *in vitro*, ヒト試験による有害性の特定 (Hazard Identification) を行い、ついで用量-反応評価 (Dose-Response Assessment) を行って非有害濃度を推定する。

いっぽう、使用するときの濃度、使用頻度、使用期間を考慮した曝露評価を行い、上記の非有害濃度との比較を行うことによってリスクの判定 (Risk Characterization) を行うのである (Fig. 2)。

消費者の使用実態はさまざまで、必ずしも企業が意図した使い方をするとは限らない。企業側からいえば

* 日本化粧品工業連合会 安全性部会
(株)資生堂 安全性・分析センター
〒224-8558 横浜市都筑区早渕 2-2-1

* Japan Cosmetic Industry Association Safety Subcommittee, SHISEIDO Co. Ltd., Safety and Analytical Research Center (2-2-1, Hayabuchi, Tsuzuki-ku, Yokohama 224-8558, Japan)

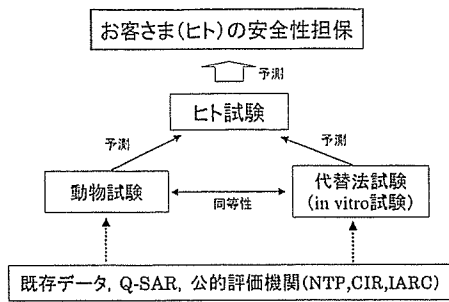


Fig. 1. Concept of safety assessment for cosmetic products.

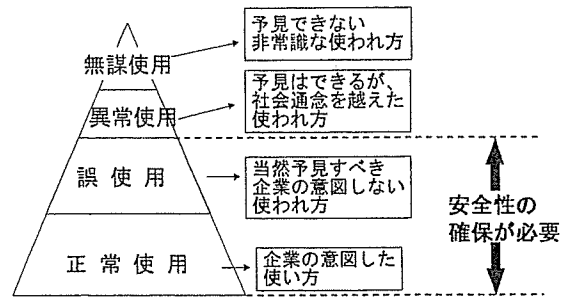


Fig. 3. Level that should be guaranteed.²⁾

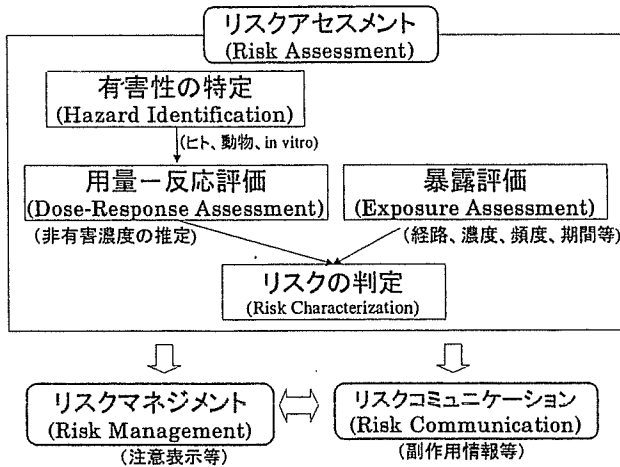


Fig. 2. Procedure for the risk assessment.¹⁾

誤った使い方すなわち誤使用であるが、企業は消費者の誤使用を予見し、社会通念をこえない予見できる誤使用までは企業の責任として安全性を担保すべきであろう (Fig. 3)。このことを考慮するとき、化粧品の安全性は、たんにリスクアセスメントにとどまらず、注意表示等のマイナス情報の提供も含めたリスクマネジメントとして考えるべきである。さらに、市場での有害事象に関する情報の把握と分析に基づいた情報の提供等のリスクコミュニケーションも考慮されるべきである (Fig. 2)。

2. 化粧品の安全性評価法と現状

わが国における化粧品の安全性評価指針策定に関しては、1986年に設置された「化粧品原料及び化粧品の安全性項目設定のための基礎研究」と題する厚生科学研究での答申がはじめて公的にまとめられたものと考えられる。この答申を受けて厚生省は、1987年6月18日付で「新規原料を配合した化粧品の製造又は輸入申請に添付すべき安全性資料の範囲について(案)」を公表した。このなかで、安全性資料の範囲として皮膚一次刺激性試験、感作性試験等九つの試験項

目が盛り込まれた。さらに試験項目ごとの標準的な試験法を作成することを目的に、1988年に厚生科学研究「新化粧品等安全性評価指針班」が設置された。この研究班の検討結果は、「新化粧品等安全性評価指針研究班報告」として標準的なガイドライン(案)がとりまとめられ、その概要については「化粧品・医薬部外品製造申請ガイドブック」(薬事日報社刊)等を通じて公開された。日本化粧品工業連合会(粧工連)では、安全性部会が中心となってこれらの厚生科学研究班に参加し、標準的な安全性試験ガイドライン作成に積極的に参画してきた。

2001年4月1日には化粧品の制度改正(規制緩和)がなされ、化粧品の承認申請制度は廃止された。これに伴い公的な「化粧品製造申請ハンドブック」も廃止されるため、粧工連では、化粧品の安全性評価に関する標準的な考え方を共有化し、拠りどころを業界として確立、維持することが必要であるとの観点から、「化粧品の安全性評価に関する指針2001」(薬事日報社刊)を独自に作成する等、化粧品の安全性確保に向け最大限の努力を行ってきた。

このような安全性試験法の整備と維持努力、および各企業の努力の結果、現在、化粧品による重大な身体トラブルは発生していないと認識している。

3. グローバル動向

化粧品の安全性評価に係わるグローバル動向としての大きな変化は、EUにおける化粧品指令の改正である。EUでは、動物実験を実施した原料を含む製品の販売禁止や代替法の使用を定めたEU化粧品指令第6次改正(1993年6月14日公布)が最も重要な法案であった。この化粧品指令第6次改正により、EUには動物実験代替法のバリデーションと公的認知を推進するための公的機関であるECVAM(European Centre for the Validation of Alternative Methods)が1991年に設置され、各種試験法のバリデーションと評価を実施して

きた。EUでは、化粧品指令第6次改正延期の最終期限である2002年6月30日を経て、2003年3月11日には、化粧品指令第7次改正が公布された。この化粧品指令第7次改正の基本的骨子は、以下のとおりである。

- ① 化粧品のEU域内での動物実験禁止
 - ・加盟国の国内法施行時点で禁止（猶予期間は最大18カ月；2004年9月）
- ② 化粧品原料のEU域内での動物実験禁止
 - ・代替法がある場合は加盟国の国内法施行時点で禁止、完全な動物実験禁止はEU化粧品指令発効の6年後（2009年3月）
- ③ 動物実験を実施した製品または動物実験を実施した原料を含む製品のEU域内の販売禁止（EU域外で動物実験がなされた製品および原料も含む）
 - ・代替法がある場合は、加盟国の国内法施行時点で禁止（猶予期間は最大18カ月；2004年9月）
 - ・完全な販売禁止は、化粧品指令発効の6年後（2009年3月）以降；例外：反復毒性、生殖毒性、薬物動態試験については2013年3月からの販売禁止
- ④ EU委員会は、OECDのバリデーションの進展を考慮した上で、SCCNFP (Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products；現SCCP) およびECVAMと協議して、種々の試験の段階的廃止に関する期限などの予定を立案する。

Table 1に各安全性評価試験法に対応する代替法の開発状況を示したが、現状で使用可能なものは眼刺激性試験（日本は独自に指針を公表）と光毒性試験のみ（これらの試験にしても適用できない物質もあり、完全な代替試験とはいいがたい）であり、今後の開発が急がれる現状にある。

米国では、1994年に関係省庁間の調整を図り代替法のバリデーションを統括する委員会（ICCVAM: Interagency Coordinating Committee for the Validation of Alternative Methods）が設置され、提案された試験法についての専門家による評価を行っている。現在ICCVAM, ECVAMは、密接な情報交換をもち、お互いが承認した試験法については完備型の評価を実施しない評価促進プロセスを適用するのみならず、急性毒性を評価するための細胞毒性試験についての共同のバリデーションを実施中である。

超国家的に毒性試験ガイドラインを検討しているOECDにおいても代替法の導入が検討されてきた。

Table 1. Current situation of alternative methods.

	安全性試験	化粧品 (非PL)	化粧品(PL) 医薬部外品	代替法
1	単回投与毒性試験	※1	○	△
2	皮膚一次刺激性試験	※1	○	△
3	光毒性試験	※1	○	○
4	眼刺激性試験	※1	○	○ (日本のみ)
5	感作性試験	※1	○	×
6	光感作性試験	※1	○	×
7	連続皮膚刺激性試験	※1	○	×
8	変異原性試験	※1	○	×
9	ヒトパッチテスト	※1	○	—
10	反復投与毒性試験	※1	○	×
11	生殖発生毒性試験	※1	○	×
12	吸収・分布・代謝・排泄	※1	○	×

※1：企業責任 △：公的機関検討中

OECDが作成した *in vitro* での毒性試験ガイドライン案としては、光毒性試験ガイドライン432案(3T3NRUPT)、皮膚腐食性試験ガイドライン430案(TER)、皮膚腐食性試験ガイドライン431案(ヒト皮膚モデル)および *in vitro* 経皮吸収試験ガイドライン428案がある。

いっぽう、本邦における動物実験代替法への行政の取組みは、眼刺激性試験を *in vitro* 試験に代替可能かを検討することを目的に、1990年に設置された厚生科学研究班「新規原料配合化粧品の安全性評価のための試験法の研究」に始まる。眼刺激性試験代替法の検討を実施した厚生科学研究班はその後も継続し、その結果、「代替法を用いて化粧品原料の眼刺激性を評価するにあたっての指針」案を1999年に公表した。

現在の厚生科学研究班「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究(2001~2003)」においては、新規 *in vitro* 経皮吸収試験法の開発研究、OECD光毒性試験ガイドライン432案(3T3N3T3NRUPT)のバリデーション、さらにはOECD光毒性試験ガイドライン432案の弱点を補強できる可能性が期待される新たな光毒性試験代替法の評価等を推進してきた。粧工連では、安全性部会や動物実験代替専門委員会が、これらの厚生科学研究班のすべての活動において、積極的に参画してきている。

4. 問題点・課題

厚生労働科学研究班における活動を通して感じる本邦における問題点・課題は、厚生労働科学研究班の結論が行政的なガイドライン等への採用に結びつかない点にあると考える。欧米においては、行政認知の評価機関（ECVAM, ICCVAM）が存在しガイドライン化へ直接結びつく体制がとられているが、本邦においては、行政認知の代替法評価機関がなく、本研究班が代替法の開発、評価研究と海外情報の調査解析を行っているに留まり、その研究成果はガイドライン作成等の行政的なとり上げまでにはいたっていない。動物実験代替法の開発と利用の促進を図るためには、本邦においても、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: Japanese Center for the Validation of Alternative Methods）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。また、代替法開発の状況を概観すると、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、これらの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が必要と考える。

参考文献

1. 山本 都: 化学物質のハザード性と安全性評価. フェルマシア, 40: 215-219, 2004.
2. ライオン (株) 家庭科学研究所編集発行: 人体安全性のサイエンス—洗剤類 (家庭用化学品) の安全性評価一, Web 2003年6月第2版.
3. 豊田英一: 厚生労働科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業) 「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」, 平成13年度~平成15年度, 分担研究報告書「代替法についての情報収集と解析, 代替法の評価」.
4. 豊田英一: 化粧品工業界における動物実験代替法の取り組みの現状, 日本動物実験代替法学会第17回大会要旨集, 118-119, 2003.
5. 豊田英一: 欧州における化粧品規制と動物実験代替法の現状, 日本動物実験代替法学会第16回大会要旨集, 45-46, 2002.

原 著

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

Proposal of the Composite Maximum Contrast Method and its Application to Toxicological Data Analysis

西山 智^{*1,*2†}・吉村 功^{*2}
Hiroshi Nishiyama^{*1,*2}, Isao Yoshimura^{*2}

^{*1}アベンティス ファーマ株式会社 生物統計・データマネジメント部
^{*2}東京理科大学大学院 工学研究科

^{*1}Biometrics & Data Management, Aventis Pharma Ltd.

^{*2}Graduate School of Engineering, Tokyo University of Science
e-mail: Nishiyama_Hiroshi@takeda.co.jp

This paper proposes to use the notion, composite maximum contrast method, for formulating recently proposed decision procedures for judging toxicity of chemical substances based on *in vitro* experiments. It is defined as the composite procedure which judges the substance in question to be positive if and only if two or more maximum contrast methods, such as Dunnett test and trend test, simultaneously realized statistical significance with a certain significance levels. SAS/IML programs are also introduced for calculating type I and/or type II error probabilities of composite maximum contrast methods. A real example of data analysis in a validation study of *in vitro* BALB/c 3T3 cell transformation assay, to which a composite maximum contrast method is applied, is also shown.

Key words: Cell transformation assay, Maximum contrast method, Multiple contrasts, Toxicological experiment, True positive probability.

1. はじめに

本論文の目的は、複合最大対比法という概念を提案し、それを実用化するための検出力、サンプルサイズ計算プログラムを示し、さらに細胞形質転換試験データの解析に複合最大対比法の1つが有効であることを示すことである。

毒性試験、特に *in vitro* 毒性試験では、得られた用量反応データに基づいて、対象とする化学物質（被験物質）が陽性（毒性あり）か陰性かの判定が目的であることが多い。その場合に興味あることは、どの用量で毒性が認められるか、用量反応関係の形状がどのようなものか、という

†現在の所属：武田薬品工業株式会社 統計解析部

Received June 2003. Revised December 2003. Accepted December 2003.

ことでなく被験物質が陽性か陰性かの判定だけである。

このような毒性試験のデータ解析法としては、古くから単回帰係数の t 検定, ダネット検定 (Dunnett, 1955), あるいはウィリアムズ検定 (Williams, 1971) などが用いられてきた。しかし毒性学研究者 (毒性家) は, これらの検定の統計的有意性で被験物質の陽性・陰性を判定することに必ずしも同意しなかった。これらの検定法で想定されている対立仮説が, 毒性家が考える用量反応関係の形状に比べて単純すぎたためと, 第 1 種の過誤と検出力のバランスが, 毒性家の経験的判断と乖離する傾向があったためである。

近年, この問題への解決策として最大対比法 (Yoshimura et al., 1997; 西山ら, 2003) を複数組み合わせた判定法が提案されている。たとえば, 小核試験で得られるデータに対しては, ダネット型の検定とコックラン・アーミテッジ検定の両者で有意であった場合にのみ, 陽性と判定する複合手順 (Kirkland ed., 1989; Hayashi et al., 1989) が提案されているし, マウスのリンパ球を用いた MLA (mouse lymphoma assay) 試験に対しては, この 2 方法に加えてマーゴリン (Simpson and Margolin, 1986) 流の手法を適用する複合手順 (Omori et al., 2002) が提案されている。本論文の著者も, 非線形な用量反応関係に対して高い検出力を持たせるために, Omori et al. (2002) の方法に, Stewart and Ruberg (2000) 提案の最大対比法を組み込むことを提案している (Nishiyama et al., 2003)。

以上述べた各種の提案は, 一般化すると複数の最大対比法を組み合わせた手法 (以下「複合最大対比法」という) で, 毒性試験データから被験物質の陽性・陰性について適切な判断を下す方法が作られる, ということである。この方針を認めると, どのような最大対比法の組み合わせが良いか, それぞれの組み合わせにおいて個々の名義有意水準をいくりにするのが良いか, その場合の検出力はいくらにするか, 必要な検出力を確保するサンプルサイズはいくらか, といったことの研究が必要になる。しかしこれらについての研究は今のところまだなされていない。

そこで著者らはこれらについての研究を行った。以下にその研究内容を報告する。すなわち第 2 章では, 複合最大対比法を定式化して, これについての検出力, サンプルサイズの計算原理を述べる。第 3 章では, 新たに作成した SAS/IML プログラムを紹介し, 簡単な複合最大対比法を例にして検出力, サンプルサイズ計算プログラムの使用例を示す。第 4 章では, 細胞形質転換試験に適用するための, 複合最大対比法を取り入れた新たな手順 (新西山手順) を紹介し, 名義有意水準をどのように取ると毒性家の経験に適合する結果が得られるか検討する。第 5 章では考察とまとめを行う。

2. 複合最大対比法

2.1 定 式 化

本論文では, 水準に順序がある一元配置型データを対象とする。想定しているのは被験物質の陽性・陰性を判定する毒性試験なので, 各水準が被験物質の用量に対応しており, かつ用量の順になっているものとする。各水準での複数の観測値はそれぞれ個々の動物, デイッシュ, ウエル (細胞液等を入れるプレート上のくぼみ) などに対応する独立な観測値とする。その関係で, 各水準を「群」と呼ぶことにする。

定式化においては、群の数を K とし、第 i 群 ($i = 1, 2, \dots, K$) の各々に n_i 個の観測値 y_{ij} ; $j = 1, 2, \dots, n_i$ があり、 $\{y_{ij}; i = 1, 2, \dots, K, j = 1, 2, \dots, n_i\}$ は互いに独立に $N(\mu_i, \sigma^2)$ に従うものとする。平均 $\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_K$ には、一般性を失うことなく、群の順に応じて単調増加という関係が想定できるものとし、その関係を「用量反応関係」と呼ぶことにする。

以下では、帰無仮説として用量反応関係がないこと、すなわち $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_K$ を想定し、それを毒性試験でよく現れる用量反応関係に対して検定することを考える。本論文ではこの帰無仮説 H_0 を永田・吉田 (1997) にならって「包括的帰無仮説」(overall null hypothesis) と呼ぶことにする。

最大対比法については、西山ら (2003) の定義を採用することにし、以下にその要点を必要最小限に引用する。

$\sum_{i=1}^K c_i = 0$ を満たす定数 c_1, c_2, \dots, c_K に対して、式 (1) で定義される統計量を「対比ベクトル $c = (c_1, c_2, \dots, c_K)'$ に対する対比統計量」という。上付きの「'」は転置である。

$$t = \frac{c' \bar{y}}{\sqrt{\hat{\sigma}^2 c' M c}} \quad (1)$$

ただし、

$$\bar{y} = (\bar{y}_1, \bar{y}_2, \dots, \bar{y}_K)', \bar{y}_i = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} y_{ij}, \quad (2)$$

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{1}{n - K} \sum_{i=1}^K \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2, n = \sum_{i=1}^K n_i, \quad (3)$$

で、 M は第 i 対角要素が $1/n_i$ の対角行列である。

複数の対比ベクトル c_1, c_2, \dots, c_m を考え、これらに対する対比統計量 t_1, t_2, \dots, t_m を用意し、その最大値

$$t_{max} = \max_{l=1, 2, \dots, m} t_l \quad (4)$$

を検定統計量にする検定法を最大対比法という。用いられる複数の対比ベクトルを式 (5) のように $m \times K$ 行列の形式に並べた対比係数行列 C を、この最大対比法の定義行列という。

$$C = (c_1, c_2, \dots, c_m)' = \begin{pmatrix} c_{11} & c_{12} & \cdots & c_{1K} \\ c_{21} & c_{22} & \cdots & c_{2K} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ c_{m1} & c_{m2} & \cdots & c_{mK} \end{pmatrix}. \quad (5)$$

複数の最大対比法の全部で有意差が認められたとき全体として有意と判定する手法を「複合最大対比法」と呼ぶことにする。これが本論文での提案である。

2.2 第 1 種の過誤と検出力の計算原理

本章では、2 つの最大対比法を含む複合最大対比法について議論を行う。この議論をより多くの最大対比法を含む場合に拡張するのは、以下の議論から自明であろう。

複合最大対比法で、含まれている2つの最大対比法の名義有意水準を独立に定めると、手法に自由度が生じすぎる。そこで両者の間に、たとえば「名義有意水準を等しくする」あるいは「2つ目の最大対比法の名義有意水準を1つ目の2倍にする」というような関係を定め、名義有意水準を1つのパラメータで表せるようにする。もっと一般には、それぞれの名義有意水準 α_1, α_2 の間に、ある指定した比率 r でもって、 $\alpha_1 = r\alpha_2$ という関係を与えるものとする。このとき、包括的帰無仮説の下での第1種の過誤確率を指定値 α 、たとえば5%にすれば2つの最大対比法の名義有意水準と棄却限界値、言い換えれば標本空間での包括的帰無仮説の棄却域は一意に定まる。

2つの最大対比法の検定統計量及び棄却限界値をそれぞれ $t_{max}^{(1)}, t_{max}^{(2)}$ 及び a_1, a_2 とすると、式(6)は、包括的帰無仮説の下で第1種の過誤確率であり、対立仮説の下では検出力である。本論文では、これを「その用量反応関係における検出力」と呼ぶことにする。

$$\Pr(t_{max}^{(1)} > a_1, t_{max}^{(2)} > a_2) = 1 - \Pr(t_{max}^{(1)} \leq a_1) - \Pr(t_{max}^{(2)} \leq a_2) + \Pr(t_{max}^{(1)} \leq a_1, t_{max}^{(2)} \leq a_2). \quad (6)$$

2.3 3群の例による説明

前節の説明のために、 $K = 3, n_1 = n_2 = n_3$ で、定義行列がそれぞれ、

$$C_1 = \begin{pmatrix} -1 & 1 & 0 \\ -1 & 0 & 1 \end{pmatrix}, \quad (7)$$

$$C_2 = (0 \quad -1 \quad 1), \quad (8)$$

の2つの最大対比法を含む複合最大対比法を考える。

この複合最大対比法に含まれる対比統計量は、 C_1 の各行に対応する対比統計量 t_1, t_2 と、 C_2 に対応する対比統計量 t_3 の3つである。この3統計量の相関行列は特異で、 $t_2 = t_1 + t_3$ という関係が成り立つ。したがって、観測されたデータが棄却域に含まれる確率は (t_1, t_3) の同時分布、すなわち相関が -0.5 の2変量 t 分布の標本空間上で計算されることになる。このとき、 (t_1, t_3) の標本空間上での複合最大対比法の棄却域は図1に示すものとなる。第1種の過誤確率と検出力は、

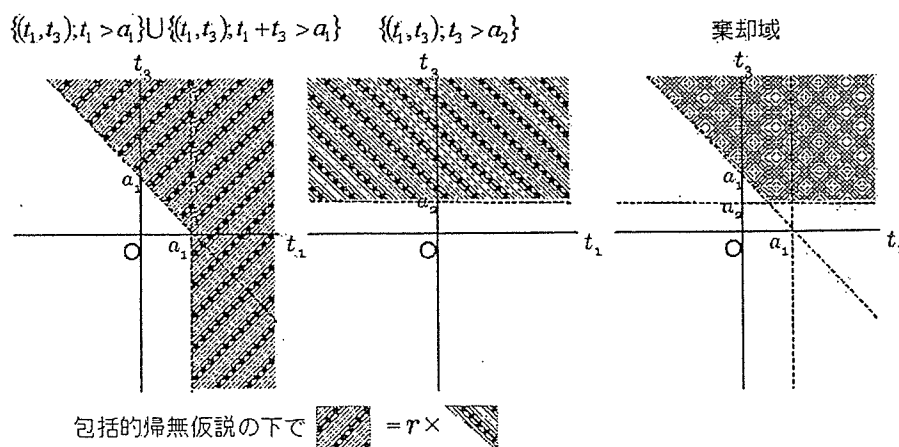


図1. 複合最大対比法の棄却域