

それぞれ包括的帰無仮説, 与えられた用量反応関係の下での, 図1に示す2次元空間領域

$$\{(t_1, t_3); t_1 > a_1\} \cup \{(t_1, t_3); t_1 + t_3 > a_1\} \cap \{(t_1, t_3); t_3 > a_2\} \quad (9)$$

の確率となる.

この例では, 図に表示する関係で1次独立な対比統計量が2次元の場合を用いたが, より高次元の場合は図に表すことが難しい. そのときは棄却域を, 集合の和と差で複数の領域に分割して確率を計算すればよい. 具体的な計算は, 含まれる最大対比法の個数に応じて, 2つの場合の式(6)のように定まるので, それに合わせて行うことになる.

3. 複合最大対比法における確率・サンプルサイズ計算プログラム

西山ら(2003)は, 任意の最大対比法の p 値, 検出力, サンプルサイズ計算を行なう SAS プログラム「sub_mvmt.sas」を紹介している.

本論文では, さらに多くのサブルーチンを作成し, 任意の2つの最大対比法において両者で有意であった場合に, 全体として有意と判定する複合最大対比法の検出力, サンプルサイズ計算のためのプログラムを「sub_mvmt.sas」に追加した. すなわち, 式(6)で定まる第1種の過誤確率と検出力計算を具体化したものである. このプログラムは非常に大きいので, 本論文では付録にも掲載していない. そこで, インターネット経由で取得できるように, 東京理科大学「医薬統計コース」ホームページ“www.rs.kagu.tus.ac.jp/yoshilab/iyaku/top.html”の「公開プログラム」の欄に圧縮ファイルで置いてある. これを取得解凍し参照されているものとして, ダネット検定と Stewart and Ruberg (2000) が提案した HU/HD 法による複合最大対比法で5群の場合を例にして, 次節において内容と使い方を説明する. その際に例示したプログラムは, CMCM.sas という名前で, 「sub_mvmt.sas」と一緒に圧縮ファイル内に置いてある. 任意の3つ以上の最大対比法の組み合わせには, 作成したプログラムは対応していないので修正を加える必要がある.

公開プログラム利用における慣例に従って, 本プログラムを利用したときは, プログラムの作成者が西山智であることを明記していただきたい.

3.1 検出力計算例

5群のダネット検定と HU/HD 法の定義行列は式(10), (11)の通りである.

$$C_{DT} = (c_1, c_2, \dots, c_4)' = \begin{pmatrix} -1 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}, \quad (10)$$

$$C_{HU/HD} = (c_1, c_2)' = \begin{pmatrix} -26 & -14 & 4 & 9 & 14 \\ -14 & -9 & -4 & 1 & 26 \end{pmatrix}. \quad (11)$$

有意水準(包括的帰無仮説の下での第1種の過誤確率)が2.5%, 各群のサンプルサイズが(17, 17, 17, 17, 17), 対立仮説の平均ベクトルが(0.0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0), $\sigma^2 = 1.0$ という場合に ついて, 検出力計算プログラムとその出力結果を表1に示す.

表 1. 検出力計算例

```

PROC IML;
  %include '(sub_mvt.sas の保存先パス)¥sub_mvt.sas';
  Alpha=0.025; Ratio_Alpha=1;
  Contrast1={-1 1 0 0 0,
             -1 0 1 0 0,
             -1 0 0 1 0,
             -1 0 0 0 1};
  Contrast2={-26 -1 4 9 14,
             -14 -9 -4 1 26};
  Expect={0 0.25 0.50 0.75 1.00};
  VARIANCE=1;
  N1=17; N_ALLOC={1 1 1 1 1};
  ABSEPS=0.0001; Eps1=0.0001;
  A1=0; A2=0.1;
  Switch=1;
  RUN ESTPOWER_CMCM(Switch,Alpha,Ratio_Alpha,A1,A2,N1,Eps1,ABSEPS,Expect,
                   VARIANCE,CONTRAST1,CONTRAST2,N_ALLOC,N,Power,
                   Crival1,Crival2,Alpha1,Alpha2);
  IF Switch=1 THEN PRINT N,, Crival1 Crival2 Alpha1 Alpha2 Power ;
  ELSE PRINT N,, Crival1 Crival2 Alpha1 Alpha2 ;
QUIT;

```

出力結果:

N				
17	17	17	17	17
CRIVAL1	CRIVAL2	ALPHA1	ALPHA2	POWER
2.2011719	1.8945313	0.0493146	0.0491975	0.8174153

このプログラムで、“%include '(sub_mvt.sas の保存先パス)¥sub_mvt.sas'” は、著者らが作成したプログラムを呼び込む指示である。

“Alpha=” には設定する有意水準 α を入れる。“Ratio_Alpha” には、2つの最大対比法の有意水準の大きさの比の関係を $\alpha_1 = r\alpha_2$ ($r \geq 1$) として与えた r を入れる。

“Contrast1=” には、1つめの最大対比法の定義行列を、各行を「,」で区切り、列間にスペースをおいて入れる。今回は5群のダネット検定なので式(10)の定義行列を入れる。“Contrast2=” には、2つめの最大対比法の定義行列を入れる。“Expect=” と “VARIANCE=” には、検出力を計算する対立仮説の平均ベクトルと分散を入れる。“N1=” には第1群のサンプルサイズを入れ、“N_ALLOC=” には第1群に対する各群のサンプルサイズの比を “N_ALLOC={1 1 1 1 1}” というように入れる。比は整数でなくても良い。

“ABSEPS=”には、求めたい計算精度を、計算値の標準誤差の3倍の値で、“ABSEPS=0.0001;”のような形で入れる。精度を標準誤差で指定するのは、このプログラムが準乱数を用いて関数値の計算点を選び数値積分をしているので、計算値にランダム性が含まれるためである。有意水準を与えて検出力を計算するときは、棄却限界値の計算が必要である。これは逐次近似で求めるので、与えた有意水準と逐次近似で計算した第1種の過誤確率との差として、求めたい精度の値を“EPS1=”に入れる。このプログラムではその精度を0.0001としてある。

“A1=”と“A2=”に入れるのは、その関係が $\alpha_1 = r\alpha_2$ で全体の有意水準を“Alpha”とする2つの最大対比法の有意水準 α_1, α_2 を逐次近似で求めるための α_1 の初期値で、それぞれ十分小さい値と大きい値の二つを指定する。

“Switch=”には、棄却限界値と検出力の両方を出力するとき“Switch=1;”を指定し、棄却限界値のみを出力するときは、1以外の値を入れる。

“ESTPOWER_CMCM”はプログラム内のサブルーチン名である。

このプログラムでは、Bretz and Genzのサブルーチンの制約によって、2つの最大対比法を構成する全ての対比統計量間の相関行列が半正定値行列 (positive semi-definite matrix) でなければならない。

上記のプログラムを実行すると出力結果の“N”には、各群のサンプルサイズが、17,17,17,17,17というように出力され、“CRIVAL1”と“CRIVAL2”には棄却限界値2.2011719と1.8945313が出力され、“ALPHA1”と“ALPHA2”には2つの最大対比法の第1種の過誤確率0.0493146と0.0491975が出力される。“POWER”には計算結果の検出力81.74153%が出力される。

3.2 サンプルサイズ計算例

前節と同じ5群のダネット検定とHU/HD法で、有意水準(包括的帰無仮説の下での第1種の過誤確率)2.5%、前節で示した対立仮説に対して検出力が80%になるサンプルサイズ計算プログラムとその出力例を表2に示す。

すでに説明したことを省くと各項目の意味・使い方は次の通りである。

“Beta=”には検出力に対応する第2種の過誤確率すなわち $1 - 0.80 = 0.20$ を入れる。このプログラムでは、“N_ALLOC=”に各群のサンプルサイズの比を入れ、第1群のサンプルサイズを計算するようにしてある。ここでは比を多くの場合と同様に1としたが、比が違っていても計算できる。

“Nmim=”と“Nmax=”に入れるのは、逐次近似における第1群のサンプルサイズの初期値で、それぞれ十分小さい値と大きい値の二つを指定する。“Eps2=”には、逐次近似で求める精度について、指定した検出力と計算した検出力の差の限界値を与える。ここでは0.01を入れている。

“DO UNTIL~END”は、初期値の下限と上限の間で必要なサンプルサイズを求めるためのプログラム、その前の“DIFF=1”、“N1=Nmax”は、そのプログラムのための初期値であり、然るべき条件を満たせば他の値でも差し支えないが、このままにしておく方が無難である。

出力結果では、サンプルサイズが小数で出力されるが、実際はその小数を下回らない整数にしなければならない。この例では、各群のサンプルサイズを17,17,17,17,17にすることになる。このときの検出力が前節で例示した81.7%で、出力として示された小数のサンプルサイズに対する

表 2. 必要サンプルサイズ計算例

```

PROC IML;
  %include '(sub_mvt.sas の保存先パス)¥sub_mvt.sas';
  Alpha=0.025; Ratio_Alpha=1; Beta=0.2;
  Contrast1={-1 1 0 0 0,
             -1 0 1 0 0,
             -1 0 0 1 0,
             -1 0 0 0 1};
  Contrast2={-26 -1 4 9 14,
             -14 -9 -4 1 26};
  Expect={0 0.25 0.50 0.75 1.00};
  VARIANCE=1; N_ALLOC={1 1 1 1 1};
  ABSEPS=0.0001; Eps1=0.0001; A1=0; A2=0.1;
  Nmin=5; Nmax=50; Eps2=0.01;
  DIFF=1; N1=Nmax;
  Switch=1;
  DO UNTIL(ABS(Power-(1-Beta))<Eps2);
    IF DIFF>0 THEN Nmax=N1; ELSE Nmin=N1;
    N1=(Nmax+Nmin)/2;
    RUN ESTPOWER_CMCM(Switch,Alpha,Ratio_Alpha,A1,A2,N1,Eps1,ABSEPS,Expect,
                     VARIANCE,CONTRAST1,CONTRAST2,N_ALLOC,N,Power,Crival1,
                     Crival2,Alpha1,Alpha2);
    DIFF=Power-(1-beta);
  END;
  PRINT N,, Crival1 Crival2 Alpha1 Alpha2 Power;
QUIT;

```

出力結果:

N				
16.25	16.25	16.25	16.25	16.25
CRIVAL1	CRIVAL2	ALPHA1	ALPHA2	POWER
2.1992188	1.8925781	0.0496686	0.0495421	0.0800529

検出力計算値 80.1% より大きくなる。

4. 細胞形質転換試験のデータ解析法への応用

4.1 2段階細胞形質転換試験の概要

がん原性における化学物質のイニシエーション活性及びプロモーション活性を検出するための *in vitro* 試験法に「BALB/c 3T3 細胞による2段階細胞形質転換試験 (cell transformation assay, CTA)」がある。CTA はイニシエータ検出試験とプロモータ検出試験の2種類からなる試験であ

る。試験の詳細は日本規格協会発行のテクニカルレポート (JSA, 2002) に委ねて、データの意味を理解するための概要紹介を行うと以下ようになる。

イニシエータ検出試験では、BALB/c 3T3 細胞を一定数入れたシャーレにプロトコルに定められた手順で被験物質を添加し、その後プロモータ処理をする。これで反応が陽性であれば、被験物質はイニシエータであることになる。プロモータ検出試験では、当該細胞を一定数入れたシャーレにイニシエータ処理を行った後で、プロトコルに定められた手順で被験物質を添加する。これで反応が陽性であれば、被験物質はプロモータであることになる。反応変数としては、ディッシュごとのフォーカス (単数で focus, 複数で foci) が用いられる。フォーカスとは、「単層培養細胞上に、がん原性物質などの処理によって形態学的形質転換を起こした細胞が高密度に増殖し形成した細胞集団」のことである。

この試験法の多施設バリデーション共同研究 (以下、「共同試験」という) が、19 施設の参加の下に日本で行われ、その結果が Tsuchiya et al. (1999) によって報告されている。この共同研究では、被験物質として、“0-Methylcholanthrene (MCA)” と “12-O-teradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)”, “dimethyl sulphoxide (DMSO)” を用いている。MCA はイニシエーション活性を持つ物質、TPA はプロモーション活性を持つ物質、DMSO は溶媒としてよく用いられている物質である。

表 3 及び図 2 に示したのは、この共同研究で得られたイニシエータ検出試験データの一部であ

表 3. 細胞形質転換試験データ

Lab.	イニシエータ MCA ($\mu\text{g/ml}$)	プロモータ TPA ($\mu\text{g/ml}$)	ディッシュ番号										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	0.5	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0
	1.0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	0.5	0	0	0	0	1	6	0	1	0	0	0	0
	1.0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
F	0	0.1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
	0.1	0.1	1	2	2	5	3	2	2	3	2	1	1
	0.2	0.1	1	5	0	3	0	2	3	2	0	1	1
	0.5	0.1	1	3	0	2	1	1	0	1	3	1	1
	1.0	0.1	2	1	0	3	0	6	3	3	1	1	1
M	0	0.1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	0.1	0.1	1	1	0	2	1	0	2	1	0	0	0
	0.2	0.1	2	2	2	0	1	1	0	1	1	2	0
	0.5	0.1	5	3	1	4	1	2	2	3	1	0	0
	1.0	0.1	0	2	2	0	0	0	0	1	1	1	1

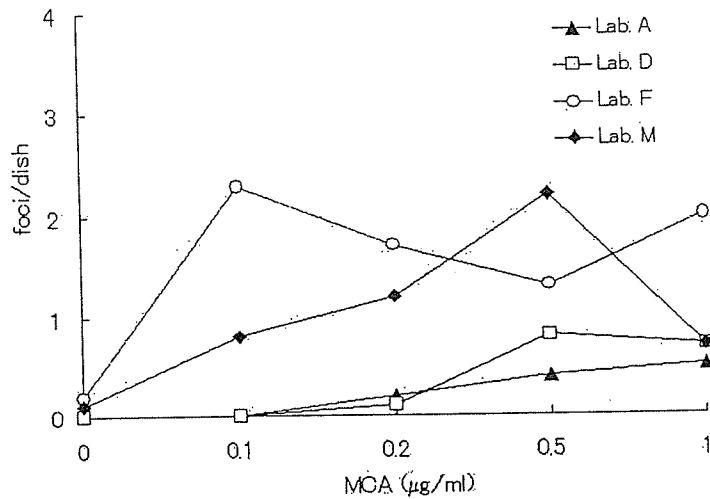


図 2. 細胞形質転換試験データ

る。観測された値は、おおむね 1 桁の整数でポアソン分布が想定できる。MCA は 5 用量に設定され、各用量で 10 ディッシュの反復観測が行われている。プロモータ処理には、プロモータでない DMSO とプロモータである TPA が用いられている。前者でフォーカス反応が陰性、後者でフォーカス反応が陽性なら MCA がイニシエータ活性を持っていて、プロモータ活性を持たないことになる。

問題はこの種のデータが得られたとき、反応が陰性か陽性かをどのような手法で判定するかである。

4.2 旧西山手順

Tsuchiya et al. (1999) で報告されている共同研究において、本論文の著者らは陽性・陰性の判断に次に示す 3 ステップの手順を提案し、適用した (Nishiyama et al., 2003)。本論文ではこれを「旧西山手順」と呼ぶことにする。

旧西山手順では、まず、観測値であるフォーカス数 y を $z = \sqrt{y} + \sqrt{y+1}$ に平方根変換する。これを正規分布に従う変数と見なして、以下の手順を適用し、陽性・陰性の判定を下す。(図 3 の左側の流れ図を参照)

1. (5 群の) データにダネット検定を適用し、有意でなければ陰性と判定する。有意であれば次のステップに進む。
2. 頭打ち現象 (down turn) を検出するマーゴリン手順を適用し、高用量で頭打ちが認められた場合には、その用量のデータを除外し、残ったデータに再びマーゴリン手順を適用する。これを繰り返して除外するデータが無くなったとき、残っているデータが 3 群以下であったら、実験が不十分であったとして、解析を打ち切り再実験を行う。4 群以上だったら次のステップに進む。
3. 定義行列が式 (12) で与えられる最大対比法を適用し、有意であれば陽性と判定し、有意でなければ陰性と判定する。

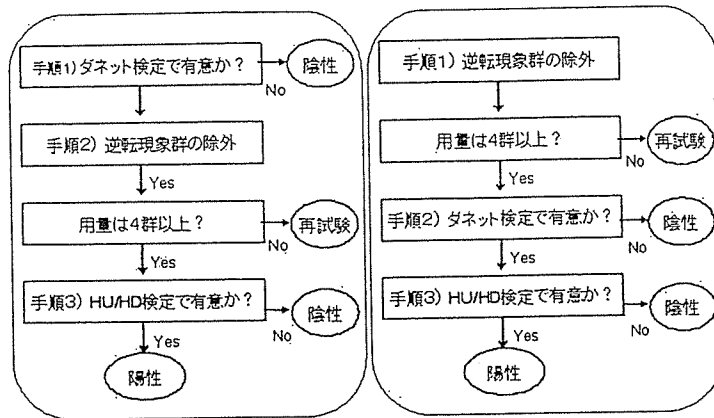


図 3. 新旧西山手順

$$C_{HU/HD} = \left(\begin{array}{l} K(1, K-1, K-1, \dots, K-1) + K(0, 1, 2, \dots, K-1) - 0.5(K-1)(3K-2)(1, 1, 1, \dots, 1) \\ K(0, 0, 0, \dots, K-1) + K(0, 1, 2, \dots, K-1) - 0.5(K-1)(K+2)(1, 1, 1, \dots, 1) \end{array} \right) \quad (12)$$

この手順において、マーゴリン手順とは、Simpson and Margolin (1986) が提案している検定法で、最高用量群の平均をそれより低用量の全群の平均と比較し、有意水準0.50で最高用量群の平均が有意に低ければ、細胞障害という毒性によって試験目的の現象が観測できなかったとするものである。彼らの論文では検定法としてノンパラメトリック検定を採用しているが、上記手順では通常の前平均値の *t* 検定を採用している。引用した論文の筆頭著者がシンプソンであるにもかかわらず、マーゴリン手順と呼ぶのは、この方針がマーゴリンの提案であることが、この分野の研究者の間で周知だからである。定義行列が式 (12) で与えられる最大対比法の意義については、Stewart and Ruberg (2000) 及び西山ら (2003) の論文に説明されている。用量反応関係が急上昇型か緩上昇型かが曖昧なときに、比較的頑健な検定法である。

4.3 新西山手順

in vitro 毒性試験での陽性・陰性の判定に、第1章で述べた複合手順を適用したとき、実験を行った毒性家から統計家に出される疑問は、慣例として用いられている0.05あるいは0.01という名義有意水準を採用すると、偽陽性が出過ぎるということである。なぜそうであるかは明確ではないが、かなり良く出される見解は、過分散現象 (overdispersion) があることと、生体 (*in vivo*) の恒常性 (homeostasis) によって *in vitro* で見られる反応が *in vivo* での予測において過大になること、の2つである。実際、Kirkland ed. (1989) では、不均質係数 (heterogeneity factor) *H* を誤差分散にかけることで、有意になりにくい判定を行うことを勧めている。

しかしながら著者らは、不均質係数の導入に疑問を持っている。実際の実験では、群間に不均質性があるような手順が取られていないし、前述の共同研究のデータではポアソンの分散指数 (Poisson index of dispersion) がほぼ1になっている。Omori et al. (2002) らが解析しているMLAの場合でも、各施設内での実験データでは過分散現象が観察されていない。不均質係数を適切に設定する根拠は一般になく、背景データから定めることも非現実的である。

そこで Hayashi et al. (1989), Omori et al. (2002), Nishiyama et al. (2003) が採用した方針は、判定手順において総合的な偽陽性確率（第1種の過誤確率）を慣例的な0.05あるいは0.01とするのではなく、毒性家の多くが判定に同意する比較的小さい値に設定することである。上記の論文では、そのような作業を通して、判定手順に含まれている個々の検定法の有意水準を調整して、総合的な偽陽性確率を0.01あるいはそれ以下にする手順を採用している。

この方針を採用したとき、問題になるのは、手順全体の総合的な偽陽性確率の計算である。上記の論文では手順を構成する個々の検定法に慣例的な名義有意水準を設定し、複数の検定のすべてで有意になることを求めることで、総合的な偽陽性確率を小さくし、モンテカルロ・シミュレーションでその値を評価した。しかしこれでは総合的な偽陽性確率の制御を任意に行うことができない。

本論文で提案している確率計算法は、これに答えようとするものであるが、マーゴリンの手順が入ると、全体が複合最大対比法にならない。

本論文では、旧西山法の第1ステップと第2ステップを逆順にすることを考えた。これは、頭打ち現象が認められた用量群を除外することのある種の予備検定と位置づけ、それ以後を本当の判定手法と考えるものであり、論理的に妥当である。ただし、予備検定、ダネット検定、式(12)の定義行列で与えられる最大対比法の検定統計量の間には相関があるので、複合最大対比法の枠内には入らない。

以下では、この新しい手順を「新西山手順」と呼ぶことにする。重複になるが、念のためその手順を以下に示しておく。(図3の右側の流れ図を参照)

1. (5群の) データにマーゴリン手順を適用し、高用量で頭打ちが認められた場合には、その用量のデータを除外し、残ったデータに再びマーゴリン手順を適用する。これを繰り返して除外するデータが無くなったとき、残っているデータが3群以下であったら、実験が不十分であったとして、解析を打ち切り再実験を行う。4群以上だったら次のステップに進む。
2. データにダネット検定を適用し、有意でなければ陰性と判定する。有意であれば次のステップに進む。
3. 定義行列が式(12)で与えられる最大対比法を適用し、有意であれば陽性と判定し、有意でなければ陰性と判定する。

4.4 新西山手順の確率計算法

5群の場合について、個々の最大対比法の名義有意水準を定めて、新西山手順の第1種の過誤確率、検出力計算は以下ようになる。

第1ステップの判定を調べるには、マーゴリン手順のための対比を考える必要がある。3群になったら再試験であるから、5群と4群の場合だけを考えればよい。そのための対比ベクトル(定義行列)は次に示す C_{M_5} , C_{M_4} の2つである。

$$C_{M_5} = \begin{pmatrix} -1 & -1 & -1 & -1 & 4 \end{pmatrix}, \quad (13)$$

$$C_{M_4} = \begin{pmatrix} -1 & -1 & -1 & 3 \end{pmatrix}, \quad (14)$$

続くステップで用いられる最大対比法の定義行列は、式(10), (11) (5群のままの場合) 及び次に

示す C_{DT_4}, C_{HUHD_4} (最高用量群が除かれた場合) である.

$$C_{DT_4} = \begin{pmatrix} -1 & 1 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 1 & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}, \quad (15)$$

$$C_{HUHD_4} = \begin{pmatrix} -15 & 1 & 5 & 9 \\ -9 & -5 & -1 & 15 \end{pmatrix}, \quad (16)$$

前節で説明したように, この手順の確率計算は, 前章で述べた複合最大対比法の枠組で計算できない. この手順の棄却確率は, 第1ステップの条件付きの確率,

$$\sum_{K=4}^5 \{P(t_{max}^{(DTK)} > a_{DTK}, t_{max}^{(HUHDK)} > a_{HUHDK}, t_{max}^{(MK)} > a_{MK}) \prod_{k=K+1}^5 P(t_{max}^{(Mk)} \leq a_{Mk})\} \quad (17)$$

で与えられ, これは包括的帰無仮説の下で第1種の過誤確率, 任意の用量反応関係に対して「その用量反応関係における検出力」である.

ただし, $t_{max}^{(MK)}, t_{max}^{(DTK)}, t_{max}^{(HUHDK)}$ 及び $a_{MK}, a_{DTK}, a_{HUHDK}$ は, それぞれ K 群の場合のマーゴリン手順の対比による検定, ダネット検定, 定義行列が式(12)で与えられる最大対比法の検定統計量及び棄却限界値である. また, $a > b$ のとき $\Pi_a^b(\cdot) = 1$ と定義する.

実際の計算では式(17)を下記のように下側積分で整理して, 各項ごとの計算値の和, 差と積の組み合わせで計算する.

$$\begin{aligned} & \sum_{K=4}^5 [\{ 1 - P(t_{max}^{(DTK)} \leq a_{DTK}) \\ & \quad - P(t_{max}^{(HUHDK)} \leq a_{HUHDK}) \\ & \quad - P(t_{max}^{(MK)} \leq a_{MK}) \\ & \quad + P(t_{max}^{(DTK)} \leq a_{DTK}, t_{max}^{(HUHDK)} \leq a_{HUHDK}) \\ & \quad + P(t_{max}^{(DTK)} \leq a_{DTK}, t_{max}^{(MK)} \leq a_{MK}) \\ & \quad + P(t_{max}^{(HUHDK)} \leq a_{HUHDK}, t_{max}^{(MK)} \leq a_{MK}) \\ & \quad - P(t_{max}^{(DTK)} \leq a_{DTK}, t_{max}^{(HUHDK)} \leq a_{HUHDK}, t_{max}^{(MK)} \leq a_{MK}) \\ & \quad \} \prod_{k=K+1}^5 P(t_{max}^{(Mk)} \leq a_{Mk})]. \end{aligned} \quad (18)$$

式(18)の計算を具体化した新西山手順の棄却限界値, 検出力, サンプルサイズの計算を行うサブルーチンプログラムを作成し, このサブルーチンを「sub_mvt.sas」に追加した. メインプログラム「NewNishiyama.sas」の使い方は, 第3章の説明と同様であるのでここでは省略する. これらも東京理科大学「医薬統計コース」ホームページから取得できる.

4.5 いくつかの手法の性能比較

2段階細胞形質転換試験で観察される用量反応関係として図4の5つの形状を考える. この形状に対して, どのような最大対比法あるいは複合最大対比法を適用するのが良いかは自明ではない. したがって, ここでは以下の4通りの方法を考えて検出力を比較して検討する.

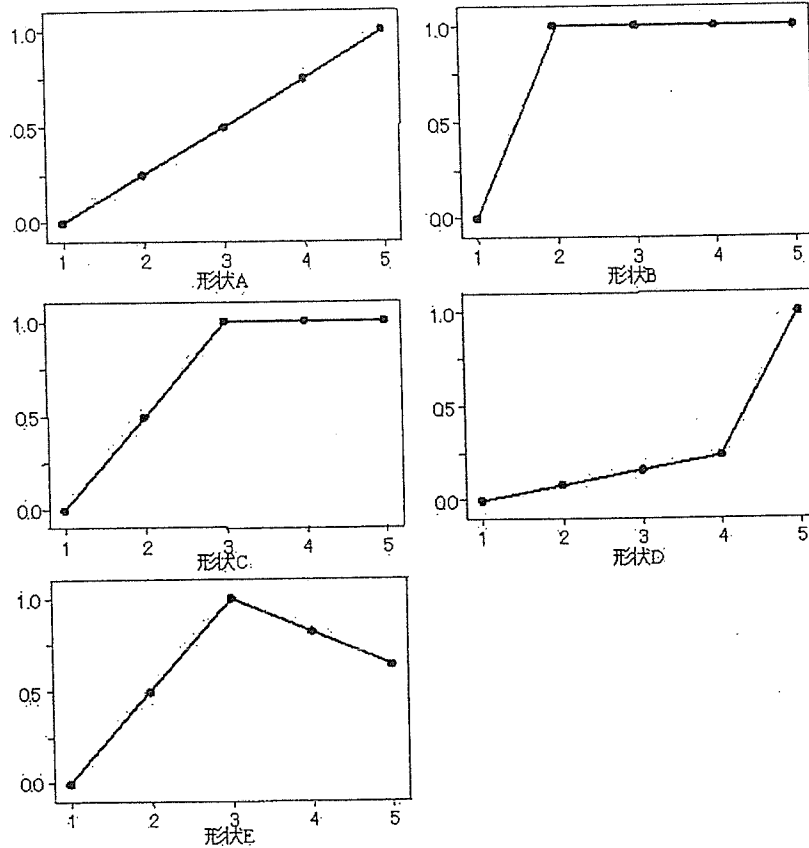


図 4. 例題において検出力を求める用量反応関係

方法 1: 定義行列 $C_{LR} = (-2, -1, 0, 1, 2)'$ の最大対比法 (LR 法), 方法 2: 定義行列がそれぞれ式 (10) と C_{LR} の 2 つの最大対比法による複合最大対比法 (ダネット&LR 法), 方法 3: 定義行列がそれぞれ式 (10) と式 (11) の 2 つの最大対比法による複合最大対比法 (ダネット&HU/HD 法), 方法 4: 第 4.3 節の新西山手順.

図 4 の 5 つの形状に対して, 上記の 4 方法で検出力 80% を保証するサンプルサイズを計算すると, 表 4 が得られる. いずれも, 有意水準は 2.5% で, 用量反応関係の上下方向の最大差は $\Delta = 1$, 誤差分散が $\sigma^2 = 1$ の場合である.

単純な LR 法は, 当然のことながら直線型の形状 A に有利である. また, 直線型に近い形状 C

表 4. 1 群あたり必要サンプルサイズ N (実際の検出力)

	LR		ダネット&LR		ダネット&HU/HD		新西山手順				
	N	検出力	$\alpha_{DT_5} = \alpha_{LR_5}$	N	検出力	$\alpha_{DT_5} = \alpha_{HUHD_5}$	N	検出力			
A	13	0.8007	0.0583	16	0.8069	0.0494	17	0.7996	0.0363	18	0.8030
B	21	0.8186	0.0583	16	0.8047	0.0492	12	0.7983	0.0361	13	0.8117
C	13	0.8007	0.0581	12	0.7903	0.0492	13	0.8005	0.0361	13	0.8008
D	18	0.8172	0.0584	19	0.8045	0.0494	19	0.8063	0.0363	20	0.7970
E	32	0.8117	0.0584	24	0.7977	0.0494	20	0.7976	0.0363	19	0.8019

や形状 D にはロバストであるが、非線形な用量反応関係には不利である。ダネット&LR 法は、ダネット&HU/HD 法や新西山手順と比べると、形状 B の飽和型や形状 E の頭打ち型に対してロバストでない。ダネット&HU/HD 法や新西山手順は、5 つの用量反応関係の全てに対してロバストである。

4.6 適用例

(表 3, 図 2) の例に示した試験データに、前節の 4 手法を適用してみよう。すでに述べたように、個々の最大対比法の名義有意水準を慣例的に使われる値 0.05 にすると、毒性家に違和感のある判定結果となる。そこで名義有意水準を 0.01, 0.001, 0.0001 と変えて、4 手法を適用すると表 5 の結果が得られる。“*” は、陽性と判定されたことを示している。

表 5. 実データへの適用

	LR			ダネット&LR			ダネット&HU/HD			新西山手順		
	0.01	0.001	0.0001	0.01	0.001	0.0001	0.01	0.001	0.0001	0.01	0.001	0.0001
A	*	*		*			*			*		
D	*	*		*			*			*		
F				*			*	*		*	*	
M	*			*	*		*	*		*	*	*

有意水準 0.001 の場合のダネット&HU/HD 法と新西山手順が、Lab.A,D は陰性で、Lab.F,M は陽性という毒性家の経験的判断と一致する。2 段階形質転換試験では名義有意水準を慣例的に使われる値 0.05 や 0.01 などにとすると、毒性学的には偽陽性が出過ぎることが分かる。

新西山手順でマーゴリンの手順を含むのは、図 2 の形状 E のような高用量で頭打ち現象のある用量反応関係でも検出力を高く保つことを意識しているが、ダネット&HU/HD 法は HU/HD 法がある程度の頭打ち現象に対してロバストな検定法であるので Lab.M を陽性と判定したと考えられる。ただし、有意水準を 0.0001 とすると、ダネット&HU/HD 法は Lab.M を陰性と判定し、新西山手順は陽性と判定しているのだから、表 4 の検出力による検討で 2 方法の性能が似通っていることから、マーゴリンの手順を含む新西山手順のほうが、頭打ち現象が多く観察されるような試験では、よりロバストな判定法となることが期待できる。

有意水準 0.001 が十分適切な値であるか、新西山手順が最も適切な手法であるかは、より多くの実験データに適用してみて経験を積み重ねる必要があるが、そのためにも本論文での確率計算法は重要な道具になるものと考えられる。

5. 考察とまとめ

5.1 複合最大対比法と最大対比法

本研究の動機は、Nishiyama et al. (2003) が提案したデータ解析法の性質を検討することであった。その過程で、解析法の性質は、本論文で複合最大対比法と名付けたものに一般化して考えると分かりやすい、という判断に至った。この概念は本論文で初めて提案したものであり、複数の最大対比法のすべてで有意差が認められたときに、包括的帰無仮説を棄却するという手法である。

複合最大対比法が最大対比法の枠組みに入らないのには、2つの側面がある。1つは、最大対比法が複数の対比統計量の1つでも大きな値を取るものがあると、包括的帰無仮説を棄却するのに対し、複合最大対比法は個々の最大対比法のすべてで有意差が認められたときのみ、全体として有意差があると判定する。前者は「または」であるのに対し、後者は「かつ」である。このため、帰無仮説の受容域（棄却域の補集合）が多角形にはなるが凸集合にならない。これは積分領域の設定を複雑にしている。

もう1つは、複合最大対比法を構成する最大対比法に別々の名義有意水準・棄却限界値を設け得ることである。これによって手法の幅が広がり、試験法ごとにかなり違った手法を構成できることになる。ただし、それを全く自由にすると手法の選択に自由度が生じすぎるので、本論文では、複数の最大対比法の有意水準に一定の関係を与えることでその自由度を1つにする、という方針を採用した。もちろんその関係をどう定めるかにもある種の自由度があるが、これは統計学の問題ではなく、手法を適用する臨床試験・毒性試験でどのようなものをシャープに検出したいかという問題である。

5.2 複合最大対比法と多重対比法

本論文が取り上げた手法に対して、Genz and Bretz (1999) や Stewart and Ruberg (2000) は多重対比法 (multiple contrast method) という名前を用いて各種の議論を行っている。これに対して著者らは、あえて複合最大対比法という名前を用いることにした。これは同じ手法に別の名前を付けたのではなく、多重対比法のうちの特別な形式のものを対象にしているためである。

その違いは、複数の対比統計量を利用するとき、対比統計量の最大値を検定統計量にするかどうかである。たとえば第4.3節で取り上げた新西山法の最初のマーゴリン手順は、多重対比法には含まれるが最大対比法ではなく、したがって複合最大対比法の枠内に収まらない。対比をある順番で、閉手順的・逐次的に利用しているのであって、最大値を検定統計量に使っていないからである。

実際、式(13)の定義行列に対応する対比統計量が有意であれば、頭下がり現象は無かったものとして次の段階に進むので、式(14)の定義行列に対応する検定は実施しない。したがってマーゴリン手順の部分は複合最大対比法の枠の外になる。新西山手順の全体は、マーゴリン手順法の結果に従属させて最大対比法を変えるから、互いに独立な最大対比法を複数組み合わせるという複合対比法の枠に収まらない。

5.3 複合最大対比法と p 値の関係

複合最大対比法では、検定統計量が複数あるので帰無仮説の分布での検定統計量の実現値より極端な領域の確率という p 値の考え方が当てはまらない。複合最大対比法は含まれる複数の最大対比法が有意であるかどうかによって判定する意思決定法である。

通常の p 値のような意味は持たないが、仮に全体の有意水準に対して有意であることを判定する指標を作るならば、与えた有意水準の関係 $\alpha_1 = r\alpha_2$ に矛盾しない以下の確率 p が考えられる。ただし、以下の記述法では $r \geq 1$ とする。

観測データに基づく2つの最大対比法の p 値、 p_1, p_2 に対して、 $\Pr(t_{max}^{(1)} > t_{max}^{(1)'}) = \max(p_1, rp_2)$, $\Pr(t_{max}^{(2)} > t_{max}^{(2)'}) = \max(p_1, rp_2)/r$ となる $t_{max}^{(2)'}, t_{max}^{(2)'}$ を新たに定めると、包括的帰無仮説の下で

の確率

$$p = P(t_{max}^{(1)} > t_{max}^{(1)'}, t_{max}^{(2)} > t_{max}^{(2)'} | H_0) \quad (19)$$

は矛盾無く ($p_1 < \alpha_1, p_2 < \alpha_2$) $\iff p < \alpha$ となる.

5.4 プログラム

ホームページ“www.rs.kagu.tus.ac.jp/yoshilab/iyaku/top.html”に展示したプログラムは, Kirkland ed., (1989) が提案している各種の手法あるいは, Hayashi et al., (1989), Kim et al., (2000a; 2000b), Omori et al., (2002) などが提案している他の複合最大対比法にも修正して利用することが可能である.

謝 辞

本論文の完成には査読者及び編集理事からの示唆・助言によるところが多い。ここに記して心から感謝の意を表する。

参考文献

- Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of the American Statistical Association*, **50**, 1096-1121.
- Genz, A. and Bretz, F. (1999). Numerical computation of multivariate t-probabilities with application to power calculation of multiple contrasts. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, **63**, 361-378.
- Hayashi, M., Yoshimura, I., Sofuni, T. and Ishidate Jr., M. (1989). In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **13**, 347-356.
- Kim, B. S., Cho, M. and Kim, H. J. (2000a). Statistical analysis of in vivo rodent micronucleus assay. *Mutation Research*, **469**, 233-241.
- Kim, B. S., Zhao B., Kim, H. J. and Cho, M. (2000b). The statistical analysis of the in vitro chromosome aberration assay using Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research*, **469**, 243-252.
- Kirkland, D. J. ed. (1989). *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 102-140.
- 永田靖, 吉田道弘 (1997). 統計的多重比較法の基礎. サイエティスト社.
- 日本工業標準調査会標準部会環境・試験循環専門委員会 (2002). TR Z 0023 化学物質のがん原性を予測するための BALB/c 3T3 細胞を用いる短期 2 段階形質転換試験. 日本規格協会.
- Nishiyama, H., Omori, T. and Yoshimura, I. (2003). A composite statistical procedure for evaluating genotoxicity using cell transformation assay data. *Environmetrics*, **14**, 183-192.
- 西山智, 柳原宏和, 吉村功 (2003). 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.
- Jpn J Biomet Vol. 25, No. 1, 2004

- Omori, T., Honma, M., Hayashi, M., Honda, Y. and Yoshimura, I. (2002). A new statistical method for evaluation of L5178Ytk+/- mammalian cell mutation data using microwell method. *Mutation Research*, **517**, 199-208.
- Simpson, D. G. and Margolin, B. H. (1986). Recursive nonparametric testing for dose-response relationship subject to downturns at high dose. *Biometrika*, **73**, 589-596.
- Stewart, W. H. and Ruberg, S. J. (2000). Detecting dose response with contrasts. *Statistics in Medicine*, **19**, 913-921.
- Tsuchiya, T., Umeda, M., Nishiyama, H., Yoshimura, I., Ajimi, S., Asakura, M., Baba, H., Dewa, Y., Ebe, Y., Fushiwaki, Y., Hamada, S., Hamamura, T., Hayashi, M., Iwase, Y., Kajiwara, Y., Kasahara, Y., Kawabata, M., Kitada, E., Kubo, K., Mashiko, K., Miura, D., Mizuhashi, F., Mizuno, F., Nakajima, M., Nakamura, Y., Nobe, N., Oishi, H., Ota, E., Sakai, A., Sato, M., Shimada, S., Sugiyama, T., Takahashi, C., Takeda, Y., Tanaka, N., Toyozumi, C., Tsutsui, T., Wakuri, S., Yajima, S., Yajima, N. (1999). An interlaboratory validation study of the improved transformation assay employing Balb/c 3T3 cells: Results of a collaborative study on the two-stage cell transformation assay by the non-genotoxic carcinogen study group. *ATLA*, **27**, 685-702.
- Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, **27**, 103-117.
- Yoshimura, I., Wakana, A. and Hamada, C. (1997). A performance comparison of maximum contrast methods to detect dose dependency. *Drug Information Journal*, **31**, 423-432.

動物実験代替法研究の重要性とその課題

—薬理学会における動物実験の問題点—

大野 泰雄

要約：薬理学は薬物の生体作用とその機序を明らかにすることを主要な目的とする学問であり、そのための多くの *in vitro* 試験方法が開発されてきた。一方、動物愛護の立場からも生命科学に用いる試験法をなるべく動物を使用しない方法に置き換え (Replacement)、使用動物数を削減し (Reduction)、動物に与える苦痛を少なくする (Refinement) という 3R の原則が求められている。1999 年にポロニアで開催された生命科学のための動物使用と動物実験代替法に関する世界会議でポロニア宣言が採択され、3R の原則を法律に組み込むこと、動物実験に関係する全ての者に教育や訓練を行う機構を設置すること、また、動物実験の科学的、倫理的妥当性を審査委員会で審査を受けるべきと勧告された。なお、薬理学会員の所属する施設での動物実験委員会の設置や倫理的な動物実験の教育には施設により差がある。第三者による評価が必要であろう。一方、動物実験代替法の開発とバリデーションを促進するため、EU では European Center for the validation of Alternative Methods (ECVAM) を 1994 年に、米国では Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) を 1993 年に設立した。わが国においても平成 17 年度予算で国立医薬品食品衛生研究所に代替法を中心とする新規安全性試験法を評価するための室が認められた。

1. 序 (3R の原則と世界の流れ)

生命科学の発展は多くの動物実験に支えられてきたし、近未来においてもその状況は変わらない。一方、実験動物の使用については古くから動物福祉と人道の立場からの批判がある。生命科学が社会に受け入

れられ、その支持を得、意味のない摩擦を避けるためには、不必要な動物実験を止め、やむを得ず行う動物実験においては適切な手続きと厳密な科学的根拠に従い、動物使用数と動物に与える苦痛を最小限にする必要がある。欧米ではこのような認識は古くからあり、1954 年には Russel と Burch により動物実験代替法 (代替法) についての 3R の原則が提案された(1)。これは研究や教育、生産などに使用される動物を用いる方法を他のものに置き換え、当初の目的を達すること (Replacement)、特定の量と質を有するデータを得るために使用する動物を必要最小限にすること、また、同じ数の動物からより多くの情報をうること (Reduction)、また、避けられない動物実験にあっては痛みや苦痛、および不快感を最低限にし、動物の福祉を向上させること (Refinement) を意味している。なお、ここで言う動物とは意識を持ち、生きている脊椎動物を意味する。3R 原則は 1980 年代以後 EU (2,3) や米国(4) において受け入れられていった。また、3R 原則の再確認と更なる促進を目的に、1999 年に開催された第 3 回国際動物実験代替法会議 (3rd World Congress on Alternatives and Animal use in Life Sciences) で動物使用と動物実験代替法についてのポロニア宣言が採択された(5-7)。この法的、科学的、倫理的な部分を表 1 に要約した。

ポロニア宣言が採択された時点では、実現困難に思われたところも多かった。しかし、その後、EU は化粧品指令第七改正 (2003.3) を行い(8)、2009 年以後は原則として化粧品の安全性評価のための動物実験を禁止した。また、EU 域外において動物を用いて安全性評価を行った化粧品の輸入を禁止する事とした。ま

キーワード：動物実験代替法、動物実験委員会、3R、バリデーション、ポロニア宣言
国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 (〒158-0098 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)
e-mail: ohno@nihs.go.jp

原稿受領日：2005 年 3 月 28 日、会誌編集委員会依頼原稿

Title: Importance of research on alternatives to animal experiments and its current issues: animal experiments in The Japanese Pharmacological Society

Author: Yasuo Ohno

表1 ポロニア宣言の要旨

- 1) 全ての国が全ての研究・試験・教育に3Rの原則を積極的に組み入れるための法的な枠組みを作るべきである。
- 2) いずれの動物実験においても、関係する科学者や行政官の全てに教育や訓練を行う公式あるいは非公式の機構が無くてはならない。
- 3) 全ての動物実験は事前に専門家により科学および倫理の両面について、独立した審査を受けなくてはならない。
- 4) 動物実験の結果得られる利益と想定される動物の苦痛の両方を評価し、計ることが審査委員会の重要な機能の一部である。
- 5) どのような状況においても許されるべきでない動物の苦痛のレベルについての国際的な合意があるべきである。
- 6) より厳しい実験動物に対する規制を避けるために動物実験を他の国に依頼することを受け入れるべきではない。

表2 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) (12)

- 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。

た、OECDは動物実験に関する人道的なエンドポイントに関するガイドライン(9)を2000年に通知した。現在改訂作業が進んでいるわが国の「動物の愛護および管理に関する法律」にも3Rの原則が盛り込まれることが予想される。更に、日本学術会議は動物実験施設とその運営の妥当性を評価するため、第三者による動物実験と施設運営の第三者評価機構設置の必要性に関する提言を行った(2004)(10)。

2. 新規安全性試験代替法の行政的受け入れとバリデーション

医薬品や農薬、化学物質の安全性評価においては、行政やOECDのような国際機関の定めた毒性試験法ガイドラインに基づいて各種の試験が実施される。これらの試験法についても、動物福祉への配慮が求められ、単回投与毒性試験においては統計的に厳密なLD₅₀値を求めないとされ、OECDでは10匹程度の動物でLD₅₀を推定する試験法(OECDガイドライン420(Fixed Dose Method), 423(Acute Toxic Class Method), 425(Up-and-Down Procedure))を採用し(2001)、従来の多数の動物を用いてLD₅₀値を求める試験法(同401)を2002年12月に廃止した。また、皮膚腐食性試験として皮膚の導電度を測定する方法や培養細胞を用いて作成した皮膚三次元モデルを用いる試験法(同430(Transcutaneous Electrical Resistance Test), 431(Human Skin Model Test))や動物の苦痛が少ない皮膚感作性試験法(同429(Local Lymph Node Assay))が採用されるなど、多くの改訂がなされた。今後もin vitroの眼刺激性試験や皮膚刺激性試験、感作性試験などの開発が期待されている。これらの試

験法については別に解説した(11)。

しかし、いくら動物愛護の声が大きくとも新しい方法を導入することにより、社会に不必要なリスクを負わせることは許されない。新たに開発された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くとの姿勢が重要である。一般にin vitro試験は動物愛護に寄与するとか、多数の被験物質を迅速かつ経済的に評価できる、感度が高い、再現性が良い、閉鎖系での研究が容易なため、実験者や環境の安全確保に有利である、また、実験条件の設定が容易であることから作用機序解明に便利であるといった利点を有するが、その一方、試験法の能力や限界について、十分な知識を持たない者が使用したり、その結果を評価すると大きな過ちを犯す可能性が高い。新しい試験法の導入に際しては、適切なバリデーションを行い、その有効性と限界を明確にした上で試験を行う目的との整合性を評価しておかなければならない。

行政目的のための安全性試験法バリデーションと受け入れの基準については、OECDで合意されている(12)。その要点を表2と表3に示した。バリデーションの詳細については別に報告した(13)。

これらの要求を満たすことは一研究室や施設では困難である。そこで、EUは代替法開発の拠点とし、代替法についてのデータベースを設置・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)。また、米国は毒性試験法の開発、バリデーション、受け入れ、

表3 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) (12)

- 1) 試験法の適切性に関する情報がある (科学的必要性, 行政目的)
- 2) 測定される指標と in vivo での作用や毒性との関係, および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, データの分析法や意志決定基準が示されている。また, 一般のものが入手可能である。
- 4) 試験法とその結果は独立した科学者により査読された出版物として得ら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4 第77回日本薬理学会でのポスター発表で用いられた試験系

試験系の種類	例数		
In vivo 実験	185	335	69.6%
薬物等で処理した動物から組織試料を採取して研究	32		
動物から抽出した試料を用いて研究	118		
In vitro 研究 (細胞株等を用いた研究)	95	138	28.7%
屠殺場から入手した試料を用いて研究	17		
ヒト試料を用いて研究	19		
アフリカツメガエル卵母細胞を用いた研究	7		
その他 (臨床試験, 情報研究等)	8	8	1.7%
合計	481	481	

2004年3月8日および9日の2日間のポスター発表についての調査結果

および国内・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 の行政機関および研究機関により ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) を 1993 年に設置した。

なお, ECVAM や ICCVAM では従来の安全性試験の代替法のみならず, 定量的構造活性相関や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を行政的試験として, 取り入れるための検討も視野に入れている。また, ECVAM と ICCVAM は評価結果の相互承認や共同バリデーションの実施などの協力を行っている。

一方, 日本では, 今まで厚生労働科学研究費の支援により, また, 日本動物実験代替法学会が中心となって, 代替法の開発とバリデーション研究が行われ, 眼刺激性試験代替法のバリデーションと指針案の作成 (14) や 3T3 細胞を用いる光毒性試験代替法の評価 (15) が行われた。また, 光毒性試験代替法改良法のバリデーションと評価, 皮膚腐食性試験代替法のバリデーションと評価, 皮膚刺激性試験代替法のバリデーション, LLNA 改良法の評価が進行中である。しかし,

ECVAM や ICCVAM のような代替法に特化した機関が無かったことから, 公的機関同士の国際協力は行えなかった。しかし, 平成 17 年度において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内に新規安全性試験法の評価のための室の設置が, 5 年間の期限つきではあるが, 認められた。これを期にわが国における代替法の評価が促進されることが期待される。

3. 薬理学会における動物実験の状況と問題点

薬理学会においても多くの動物実験が行われている。2004 年春に開催された年会においてポスター発表された研究によれば, 表 4, 5 に示したように発表の約 7 割が何らかの形で生きている動物を用いた研究であり, 細胞株や屠殺場から入手した試料やヒト試料を用いた in vitro 研究が約 3 割であった。動物実験を行った 16 施設の発表者に動物実験委員会 (ICACU) の設置状況と動物実験実施手続きについてインタビューした結果, 2つの大学で ICACU が設置されていない, また, 1 大学で試験計画書の提出は行われていないとの回答があった。文部省は昭和 62 年に動物実験委員会の設置を求めている (16) ことから, 実際はこれらの大学においても設置されているものと推定されるが, 研究者や学生に適切な動物実験教育が行われておらず, また, 動物実験委員会が適切に機能していないものと

表5 実験動物委員会についてのポスター発表者へのインタビュー結果

施設	動物実験委員会の有無	申請手順	備考
医学部 1	有	実験計画毎に予想される動物の痛みと苦痛、および研究から得られる成果を含む計画書を提出	
医学部 2	有	同上	ポスターに明記
医学部 3	有	同上	
医学部 4	有	同上	
医学部 5	有	同上	
医学部 6	有	同上	ポスターに明記
医学部 7	有	同上	講習を受ける
医学部 8	有	同上	
医学部 9	有	同上	
薬学部 1	有	同上	
薬学部 2	有	同上	テーマは書くが詳しい事は書かない
薬学部 3	有	同上	年に1回まとめて申請
薬学部 4	有	動物購入毎に申請。他は同上	
薬学部 5	無	動物購入毎に書類を提出	
薬学部 6	無		
農学部	有	個別テーマ毎に動物に与える予想苦痛と予想研究成果を記載して申請	
受託機関	有	同上	
その他	有	動物購入毎に申請。他は同上	

第77回日本薬理学会年会(2004年3月)で動物実験結果についてポスター発表を行っていた若い研究者および学生へのインタビュー結果であり、事実とは異なる可能性がある。

推定された。一方で、委員会の承認を得たことをポスターに明記した発表者、学内で動物実験の倫理的側面について講習を受けたと答えた発表者もあり、実際の運用には施設により大きな差がある。日本薬理学会企画教育委員会では薬理学研究における動物実験が国際的水準で行われることが必要と考え、現在、動物実験指針の見直しを進めているが、改訂されても実行されなければ意味が無い。薬理学研究が社会に受け入れられ、支持を受けるためには、また、会員が研究のためのファンドを獲得し、研究成果を世界に発信するためには倫理的に適切な動物実験が行われるよう研究者と施設管理者が一体となって取り組むことが不可欠である。AALAC international (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International) (17) や学術会議の提言(10) で示されたような第三者による動物実験施設とその運営の妥当性評価が我が国でも必要であろう。

4. 最後に

日本動物実験代替法学会では設立以来、動物実験代替法のバリデーションや評価を行うとともに、補助を通じた研究支援、大会やシンポジウムを通じた研発表と代替法や倫理的な動物実験に関する教育を行ってきた。また、市民講座等を開催し、研究者間の情報交換や民との交流を深めてきた。また、2007年8月に第回国際動物実験代替法会議を日本トキシコロジー学日本実験動物学会、日本実験動物環境研究会、日本環境変異原学会、国際トキシコロジー学会の協賛を得東京都江戸川区のタワーホール船堀で開催する予定である。本大会は2009年のEUの化粧品の安全性評のための動物実験の原則廃止に向けて、それまでの研究成果をまとめ、必要な研究計画を立てる重要な時にあたる。薬理学会からも多数の参加を期待してい

文 献

- 1) Russel WMS, et al. The Principles of Human Experimental Technique. Methuen; 1959.
- 2) Council of Europe. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. 1986. p.51.
- 3) EEC. Official Journal of the European Communities. 1986. L358, p.1-29.
- 4) US Congress. Alternatives to Animal Use in Research, Testing and Education. US Congress Office of Technology Assessment. 1986. p.441.
- 5) Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation. Developments in animal and veterinary sciences. Elsevier; 2000. 31A. p.15.
- 6) Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation. Developments in animal and veterinary sciences. Elsevier; 2000. 31A. p.17.
- 7) 日本動物実験代替法学会ホームページ <http://www.soc.nii.ac.jp/jsaae/>
- 8) Official Journal of the European Union. L66, 11/03/2003; P0026-0035.
- 9) OECD. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. 2000. No.19.
- 10) 日本学術会議第7部報告. 動物実験・施設運営の第三者評価機構の設置について(提言)平成16年.
- 11) 大野泰雄. 皮膚と美容. 2003;35:2-8.
- 12) OECD. Final report of the OECD workshop on harmonization of validation and acceptance criteria for alternative toxicological test methods, OECD: ENV/MC/CHEM/TG(96)9. 1996.
- 13) 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. 2004;122:1-9.
- 14) 大野泰雄. フレグランスジャーナル. 1999;7:21-26.
- 15) Ohno Y, et al. Balb/c 3T3細胞を用い Neutral red 取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価結果. AATEX. 2005;10:50-157.
- 16) 文部省学術国際局長通知. 大学等における動物実験について(通知), 文学情第141号(昭和62年5月25日). 1987.
- 17) AALAC international ホームページ, <http://www.aalac.org/>

著者プロフィール

大野 泰雄 (おおの やすお)

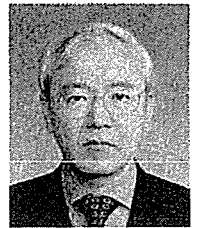
資格：薬学博士，薬剤師，日本トキシコロジー学会認定トキシコロジスト

学歴：昭和51年3月 東京大学薬学系大学院博士過程修了

現職：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長

学会役員：日本薬理学会（学術評議員 企画教育委員会委員），日本トキシコロジー学会（教育委員会委員），日本動物実験代替法学会（前会長），HAB協議会（評議員），日本薬物動態学会（理事）

その他：薬事食品衛生審議会 第一部会 臨時委員，食品安全委員会 専門委員



洞穴の彩色画（サンタバーバラ）

X.H

4. 手術摘出肝組織からの肝細胞調製とヒト肝細胞を用いた試験系のバリデーション

大野 泰雄* 酒見 和枝* 簾内 桃子*

1. 序

ヒトと実験動物との間には様々な種差があり、医薬品開発において臨床試験段階で思わぬ副作用が現れ、開発停止に至ることが多い。このような種差には投与後の血中濃度や標的臓器での分布量で代表される薬物動態面と標的臓器/組織での薬物の作用に関わる薬力学的面がある。この前者による障害を克服するため、ヒト肝臓由来標本を用いた試験が広く行われるようになった。しかし、日本人由来ヒト組織を入手することは、一般に困難であったことから、ヒューマンサイエンス財団の支援を受け、1) 公的ガイドラインに従い、外科手術切除ヒト組織の医学研究利用ネットワーク体制を構築するための一環として、獨協医科大学において肝臓手術したときに得られる肝臓片の病巣部以外の部分から薬物代謝研究のための遊離肝細胞調製を行い、配布を試みた。また、2) 外国よりヒト肝細胞を入手し、薬物代謝研究への応用の妥当性を検討した。

2. 手術摘出肝組織からのヒト肝細胞調製

獨協医科大学において、HIV、HBV、HCV、梅毒感染の無い患者から肝臓手術時に摘出した肝切除片の病巣部以外の部分を切り出し、氷冷ヘパリン含有生理食塩水を灌流・脱血した後、氷冷L-15培地に交換し、氷冷下バイク便で約2時間かけ、国立衛研へ輸送した。この肝臓切片より、2段階コラゲナーゼ灌流法による肝細胞を調製した。なお、遠距離輸送されたヒト肝臓より肝細胞を調製するための技術を確認するために、類似した条件下においたウサギおよびイヌ肝臓片より肝細胞を調製し、十分なviabilityと収量が得られることを確認したのち、ヒト肝臓からの肝細胞調製を試みた。なお、国立医薬品食品衛生研究所および獨協医科大学の倫理委員会で承認を得て研究を実施した。

獨協医科大学病院より提供された肝臓は平成14年3月より平成16年1月まで総数27件で、その内肝細胞

調製を試みられるようなブロック試料の提供は12例であった。なお、提供患者の多くは転移性肝臓癌であったが、胆管癌、肝細胞癌の患者もいた。これらの肝臓より肝細胞を調製したのは12例で、実際に肝細胞調製できたのは7例、得られた肝細胞のviabilityは平均57.0%で、その収量は平均 0.37×10^6 cell/g liverと少なかった。これらの内、代謝活性測定に利用できたのは4例であった。なお、提供された肝はいずれも線維化や黄疸が著しく、正常と思われる肝臓はわずかであった。これらの細胞の薬物代謝活性を測定したところ、testosterone 6 β -hydroxylation活性は 512 ± 367 (n=4)であり、Gentest社より購入したものとはほぼ従来の報告と同じ活性であった。

3. 凍結融解ヒト肝細胞での代謝経路の*in vivo*との比較

凍結ヒト肝細胞を米国XenoTech, LLC社より3ロット購入し、HEPES-Krebs Henseleit Buffer (pH 7.4) で生細胞数が約 6.0×10^6 cells/mLとなるように調製し、24-well plateに播種した後、37℃のCO₂インキュベーター内で薬物代謝活性を測定した。その結果、表に示したように、3ロットの結果を総合的に評価すると、第一相および第二相の代謝物が、ほぼ*in vivo*と対応して認められた。なお、イミダプリルの代謝物M2, M3, M4は消化管で主に生成する加水分解代謝物である。また、ニトラゼパムの還元代謝物は肝細胞を低酸素状態におくことにより多く生成した。なお、ロットによっては代謝活性が低い場合があり、注意が必要である。

4. Poor metabolizer (PM) および Extensive metabolizer (EM) 由来の凍結ヒト肝細胞を用いた代謝

遺伝多型が知られている薬物代謝酵素チトクロムP450のうち、CYP2D6の欠損したPM凍結遊離肝細胞を用い、PMの薬物動態(代謝)が予見できるかどうかをdextromethorphan (DEX)をプローブとし、N-脱メチル化体(3-MEM, 主にCYP3A4による代謝)、O-脱メチル化体(DXO, 主にCYP2D6による代謝)とそれに続くグルクロン酸抱合体生成で検討した。

* 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
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1