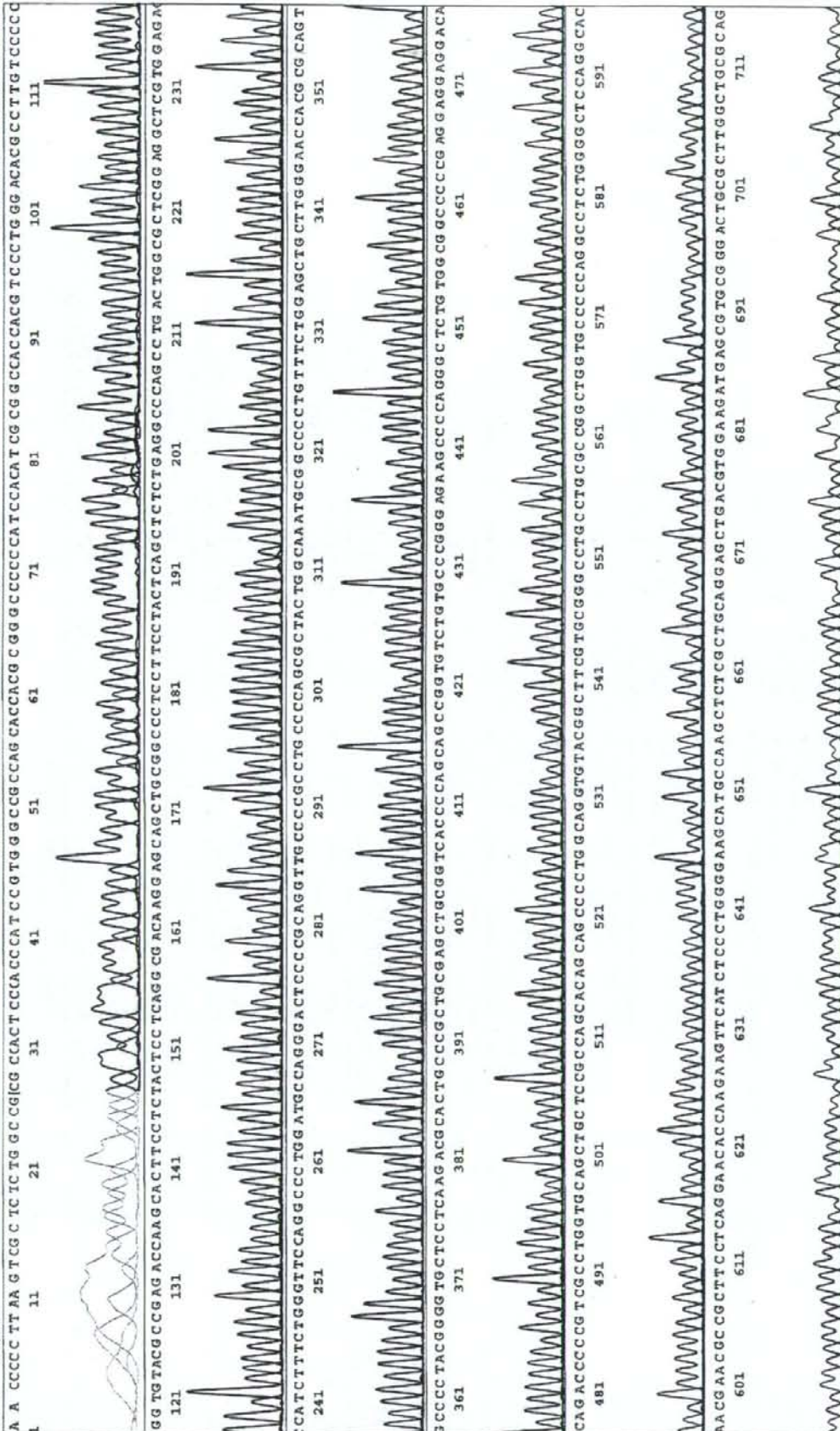


S/N G:89 A:33 T:35 C:71
KB.bcp
KB 1.2 Cap:92
Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 968
Pls 1987 to 15980 PK1 Loc:1986
KB 3730_POPT7_BDTV3.mob
SYN1956-2_SYN1918P3
SYN1956-2_SYN1918P3
Inst Model/Name 3730/3730XL-N01-17119-009
Sep 09,2008 10:07PM, CST
Sep 09,2008 10:30PM, CST
Spacing:15.2 Pts/Panel1430
Plate Name: 20080909N01R02



SYN1956-2_SYN1918P5
SYN1956-2_SYN1918P5
KB_3730_POPT_BDTV3.mob
Pls 1960 to 15960 Pk1 Loc:1959
Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 946

Inst Model/Name: 3730/3730XL-N01-17119-009
Sep 09, 2008 10:07PM, CST
Sep 09, 2008 10:30PM, CST
Spacing: 15.13 Pls/Panel/1430
Plate Name: 20080909N01R02

S/N G:44 A:21 T:19 C:34
KB.bcp
KB 1.2 Cap:88

A A G G C T C T A T T A C G G A G A G T G T C T G G A G C A I G T T G C R A A G C A T T G G R A T C A G A C A G C A C T T G A A G A G G G T G C A G C T G C G G A G C T G C G G A A G C A G A G G T C A G G C A G C A T C G G A A G

11 111
121 131 141 151 161 171 181 191 201 211 221 231
C C A G G C C C C T G C T G A C G T C C A G A C T C C G C T T C A T C C C A A G C C T G A C G G C T G C G G C C A T T G T G A A C A T G G A C T A C G T C T G G A G C C A G A A C G T T C C G C A G A G A A A A G A G G G C C G A

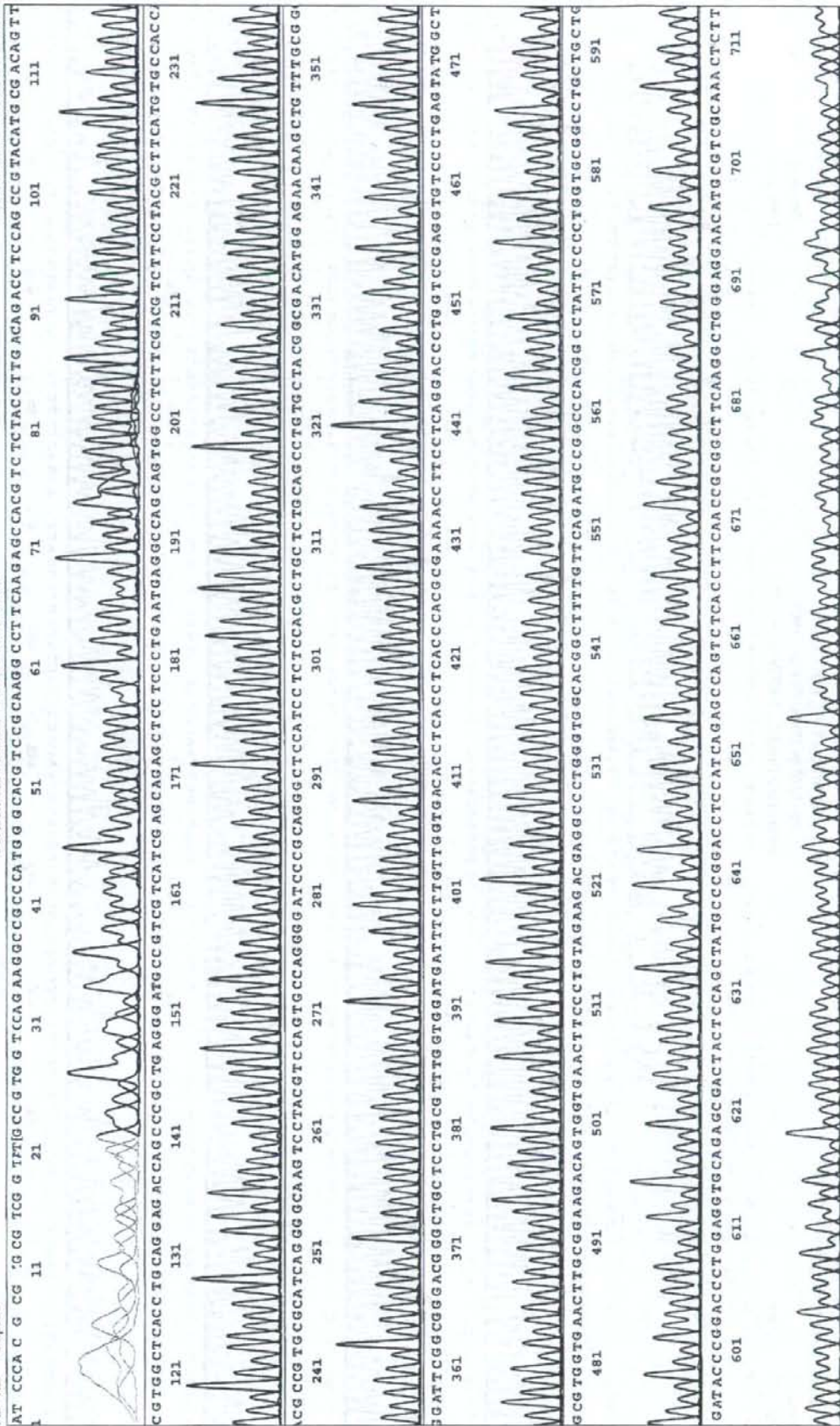
241 251 261 271 281 291 301 311 321 331 341 351
J C G T C A C C T C G A G G T G A A G G C A C T G T T C A G C G G T G C T A C A C T A C G A G C G G G C C C G G C C T C C T G G C G C T C T G T G C T G G G C C T G G A C G A T A T C C A C A G A G G C C T G G C G C A C C

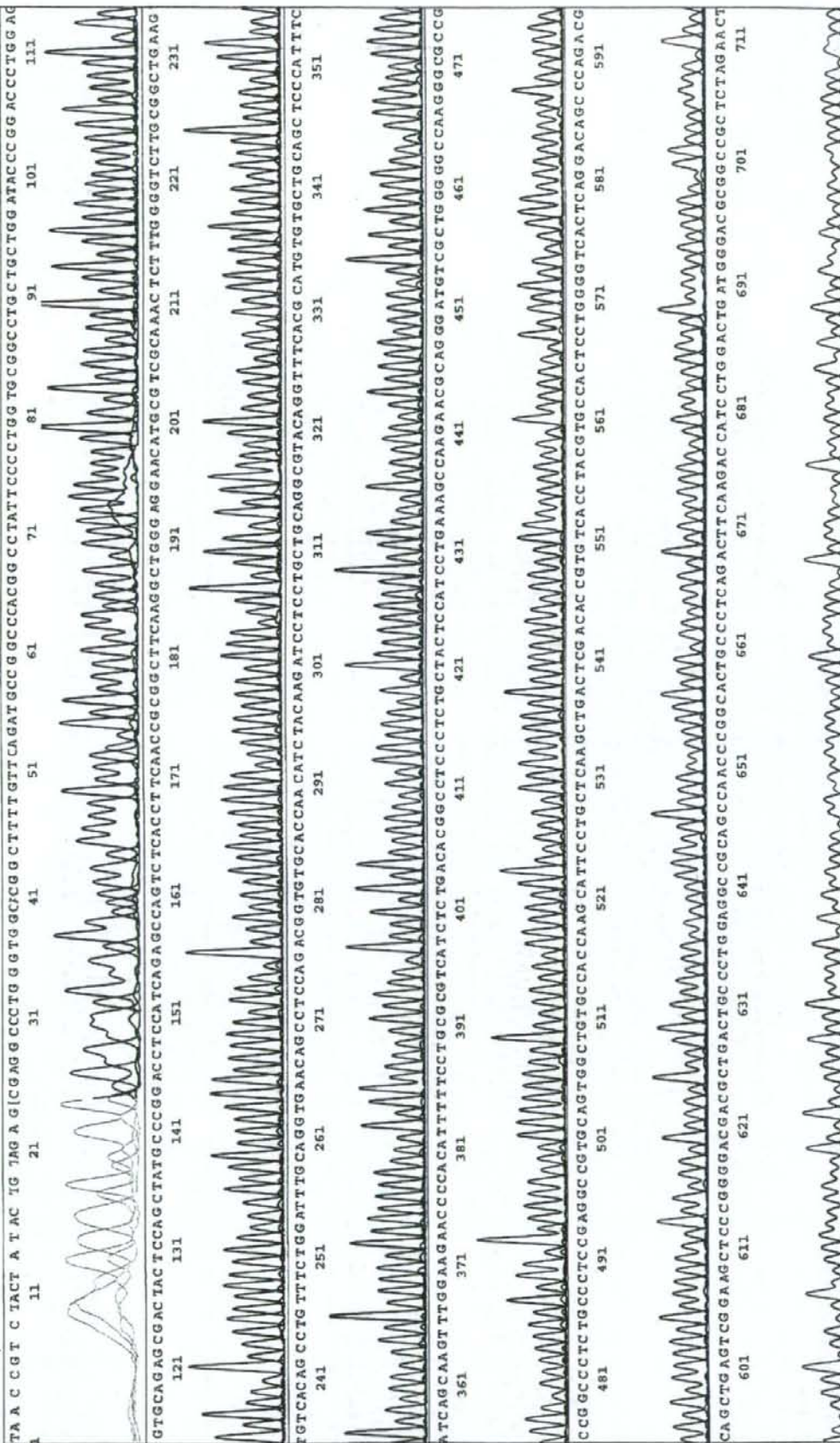
361 371 381 391 401 411 421 431 441 451 461 471
T T C G T G C T G C T G T G C G G C C C A G A C C C G C C G C C T G A G C T G T A C T T T G T C A A G G T G G A T G T G A C G G G C G C G T A C G A C A C C A T C C C C A G G A C A G G C T C A C G G A G G T C A T C G C A G C A T

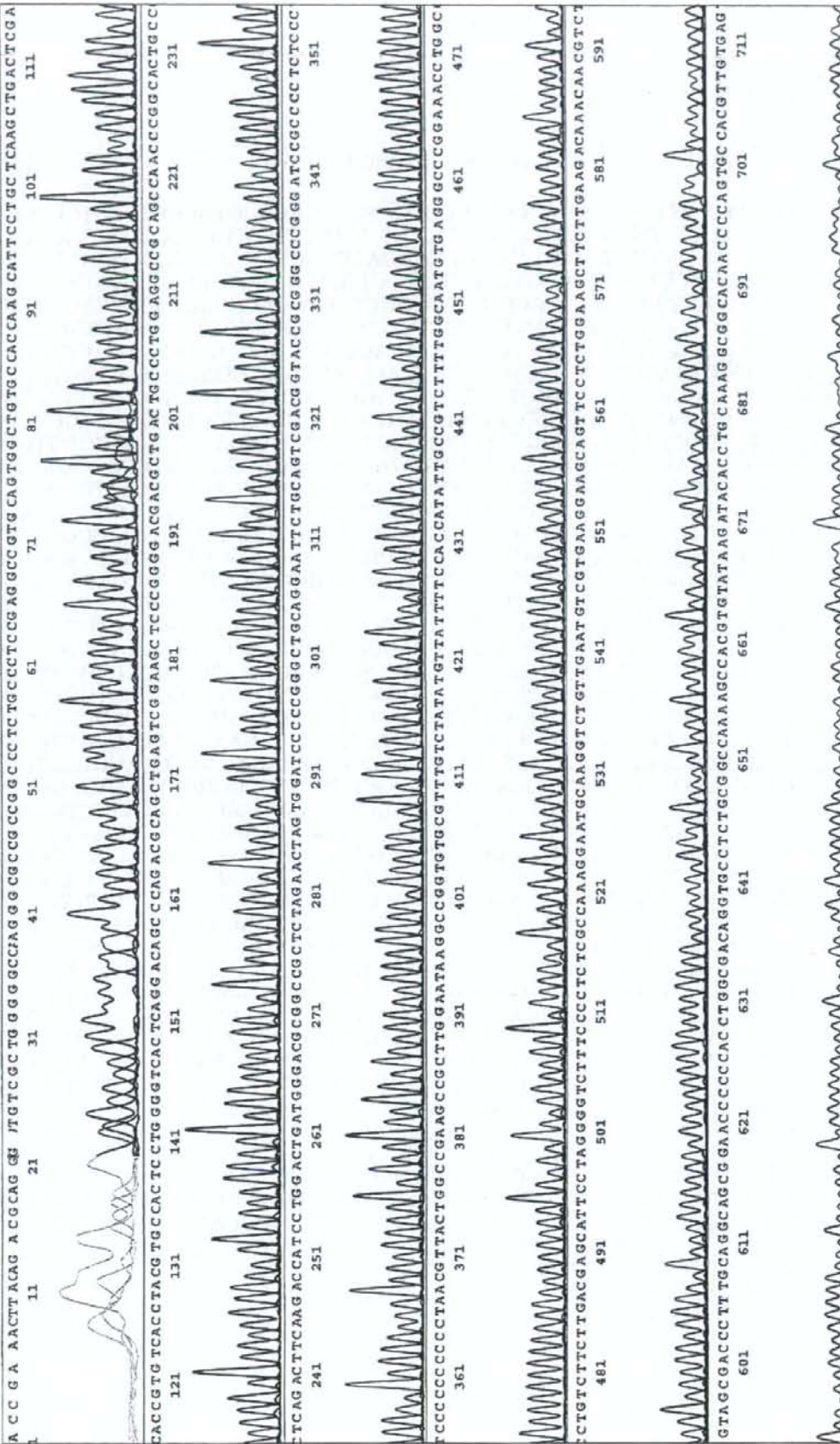
481 491 501 511 521 531 541 551 561 571 581 591
T A T C A A A C C C C A G A A C A C G T A C T G C G T G C G T C G G T A T G C C G T G G T C C A G A A G C C G C C C A T G G C A C G T C C G C A A G G C T T C A A G A G C C A C G T C T C T A C C T T G A C A G A C C T C C A G C C G T

601 611 621 631 641 651 661 671 681 691 701 711
A C A T G C G A C A G T T C G T G G C T C A C C T G C A G G A C C C G C T G A G G G A T G C C T G A T C G A G C A G A G C T C C T C C T G A A T G A G C C A G C A G T G G C T C T T C G A C G T C T T C C T A C C

Electropherogram Data Page 1 of 1







telomerase reverse transcriptase (hTERT) DNA シーケンス結果

GAATTCACCATGCCGCGCGCTCCCCGCTGCCGAGCCGTGCGCTCCCTGCTGCGC
 AGCCACTACCGGAGGTGCTGCCGCTGGCCACGTTCTGTCGGCGCCTGGGGCCCC
 AGGGCTGGCGGCTGGTGCAGCGCGGGACCCGGCGGCTTTCCGCGCGCTGGTGG
 CCCAGTGCCTGGTGTGCGTGCCTGGGACGCACGGCCGCCCCCGCGCCCCCTC
 CTCCGCCAGGTGCTCCTGCCTGAAGGAGCTGGTGGCCCGAGTGTGCAGAGGCTG
 TGCGAGCGCGGCGGAAGAACGTGCTGGCCTTCGGCTTCGCGCTGCTGGACGGG
 GCCCCGCGGGGCCCCCGAGGCCTTACCACCAGCGTGGCAGCTACCTGCCCA
 ACACGGTGACCGACGCTGCGGGGGAGCGGGGGCTGGGGGCTGCTGCGCC
 GCGTGGGCGACGACGTGCTGGTTCACTGCTGGCACGCTGCGCGCTCTTTGTGCT
 GGTGGCTCCAGCTGCGCCTACCAGGTGTGCGGGCCGCGCTGTACCAGCTCGGC
 GCTGCCACTCAGGCCCGGCCCCGCCACACGCTAGTGGACCCCGAAGGCGTCTGG
 GATGCGAACGGGCTGGAACCATAGCGTCAGGGAGCCGGGGTCCCCCTGGGCCT
 GCCAGCCCCGGGTGCGAGGAGGCGCGGGGGCAGTGCCAGCCGAAGTCTGCCGTT
 GCCAAGAGGGCCAGGCGTGGCGCTGCCCCGAGCCGGAGCGGACGCCCCGTTGG
 GCAGGGTCTCTGGGCCACCCGGGCAGGACGCGTGGACCGAGTGACCGTGGTTT
 CTGTGTGGTGTACCTGCCAGACCCGCCGAAGAAGCCACCTCTTTGGAGGGTGGC
 CTCTCTGGCACGCGCCACTCCCACCCATCCGTGGGCCGCCAGCACCCAGCGGGCC
 CCCCATCCACATCGCGGCCACCACGTCCCTGGGACACGCCTTGTCCCCCGGTGTAC
 GCCGAGACCAAGCACTTCTCTACTCCTCAGGCGACAAGGAGCAGCTGCGGCCCT
 CCTTCTACTCAGTCTCTGAGGCCAGCCCTGACTGGCGCTCGGAGGCTCGTGGGA
 GACCATCTTTCTGGGTTCCAGGCCCTGGATGCCAGGGACTCCCCCGAGGTTGCC
 CGCCTGCCCCAGCGCTACTGGCAAATGCGGCCCTGTTTTCTGGAGCTGCTTGGGA
 ACCACGCGCAGTGCCCCCTACGGGGTGTCTCTCAAGACGCACTGCCCGCTGCGAGC
 TGCGGTACCCCAGCAGCCGGTGTCTGTGCCCGGGAGAAGCCCCAGGGCTCTGTG
 GCGGCCCCCGAGGAGGAGGACACAGACCCCGTGCCTGGTGCAGCTGCTCCGC
 CAGCACAGCAGCCCCCTGGCAGGTGTACGGCTTCGTGCGGGCCTGCCTGCGCCGGC
 TGGTCCCCCAGGCCCTCTGGGGCTCCAGGCACAACGAACGCGCTTCTCAGGAA
 CACCAAGAAGTTCATCTCCCTGGGGAAGCATGCCAAGCTCTCGCTGCAGGAGCTG
 ACGTGGAAAGATGAGCGTGCGGGACTGCGCTTGGCTGCGCAGGAGCCCAGGGGTT
 GGCTGTGTTCCGGCCGAGAGCACCGTCTGCGTGAGGAGATCCTGGCCAAGTTCC
 TGCCTGGCTGATGAGTGTGTACGTGCTGAGCTGCTCAGGTCTTTCTTTTATGTC
 ACGGAGACCACGTTTTCAAAAAGAACAGGCTCTTTTTCTACCGGAAGAGTGTCTGGA
 GCAAGTTGCAAAGCATTGGAATCAGACAGCACTTGAAGAGGGTGCAGCTGCGGGA
 GCTGTGCGGAAGCAGAGGTACGGCAGCATCGGGAAGCCAGGCCCGCCCTGCTGAC
 GTCCAGACTCCGCTTCATCCCCAAGCCTGACGGGCTGCGGCCGATTGTGAACATG
 GACTACGTGCTGGGAGCCAGAACGTTCCCGCAGAGAAAAGAGGGCCGAGCGTCTCA
 CCTCGAGGGTGAAGGCACTGTTACGCGTGTCAACTACGAGCGGGCGCGCGCCC
 CGGCCTCTGGGCGCCTCTGTGCTGGGCCTGGACGATATCCACAGGGCCTGGCGC
 ACCTTCGTGCTGCGTGTGCGGGCCAGGACCCCGCCCTGAGCTGTACTTTGTCA
 AGGTGGATGTGACGGGCGCGTACGACACCATCCCCCAGGACAGGCTCACGGAGGT
 CATCGCCAGCATCATCAAACCCAGAACACGTA CTGCGTGCCTGCGGTATGCCGTGG
 TCCAGAAGGCCCGCCATGGGCACGTCCGCAAGGCCTTCAAGAGCCACGTCTCTAC
 CTTGACAGACCTCCAGCCGTACATGCGACAGTTCGTGGCTCACCTGCAGGAGACC
 AGCCCCTGAGGGATGCCGTCGTCATCGAGCAGAGCTCCTCCCTGAATGAGGCCA
 GCAGTGGCCTCTCGACGCTTCTCTACGCTTCATGTGCCACCACGCGCTGCGCATC
 AGGGCAAGTCTTACGCTCAGTGCAGGGGATCCCCGACAGGCTCCATCTCTCCA
 CGCTGCTCTGCAGCCTGTGCTACGGCGACATGGAGAAACAAGCTGTTTGGGGGAT
 TCGGCGGGACGGGCTGCTCCTGCGTTTTGGTGGATGATTTCTTGTGGTGACACCTC
 ACCTCACCCACGCGAAAACCTTCTCAGGACCCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAGTAT

GGCTGCGTGGTGAACCTTGC GGAAGACAGTGGTGAACCTCCCTGTAGAAGACGAGG
CCCTGGGTGGCACGGCTTTTGTTCAGATGCCGGCCACGGCCTATTCCCCTGGTGC
GGCCTGCTGCTGGATACCCGGACCCTGGAGGTGCAGAGCGACTACTCCAGCTATG
CCCGGACCTCCATCAGAGCCAGTCTCACCTTCAACCGCGGCTTCAAGGCTGGGAG
GAACATGCGTCGCAAACCTCTTTGGGGTCTTGCGGGCTGAAGTGTACAGCCTGTTTC
TGGATTTGCAGGTGAACAGCCTCCAGACGGTGTGCACCAACATCTACAAGATCCTC
CTGCTGCAGGCGTACAGGTTTCACGCATGTGTGCTGCAGCTCCCATTTTCATCAGCA
AGTTTGGGAAGAACCCACATTTTTCTGCGCGTCATCTCTGACACGGCCTCCCTCT
GCTACTCCATCCTGAAAGCCAAGAACGCAGGGATGTCGCTGGGGGCAAGGGCGC
CGCCGGCCCTCTGCCCTCCGAGGCCGTGCAGTGGCTGTGCCACCAAGCATTCTG
CTCAAGCTGACTCGACACCGTGTACCTACGTGCCACTCCTGGGGTCACTCAGGA
CAGCCCAGACGCAGCTGAGTCGGAAGCTCCCGGGGACGACGCTGACTGCCCTGGA
GGCCGAGCCAACCCGGCACTGCCCTCAGACTTCAAGACCATCCTGGACTGATGG
GACGCGGCCGCTCTAGAAGTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTC

分担研究報告書

「バリデーショナルデータの統計解析」(平成20年度研究) 報告

分担研究者：大森崇

研究要旨

【背景と目的】 バリデーショナル研究によって適切だと認められた代替法を利用する際に、動物実験の毒性のスコアを予測することはリスク評価を行う上で有用であると思われる。本研究は、昨年に引き続き予測方法を構築することを目的とする。

【方法】 バリデーショナル研究によって認められた代替法を用いる実験が、未知の被験物質とともに同時に3つの程度の陽性対照物質の実験を行うことを想定する。その代替法のバリデーショナル研究のデータを事前情報として利用して、ベイズ回帰によって直線を推定し、予測分布のパラメータの推定するという形で予測を行うという方法を提案する。提案法では予測値の区間推定を行うことが可能である。

【結果】 わが国で実施されたドレイズ眼刺激性試験代替法のバリデーショナル研究で報告された細胞毒性試験の一つである SIRC-CV のデータを利用して、そのデータ解析を行うことで提案する方法を適用した。適用結果からは、事前情報と陽性対照の物質数の比をどの程度取るべきか基準が必要である、信頼区間の幅は広く適用したままの結果を実用するのは十分ではない、ことが明らかになった。

【結論】 昨年の課題であった方法論の構築はほぼ確立できた。しかし、事例として適用した結果からは、上記の2点はさらに検討すべき課題である。

A. 研究目的

動物を用いない試験法で化学物質の安全性を評価するため動物実験代替法の開発が進められている。開発された代替法の有用性の評価として、施設間で再現性のある結果が得られるか、対象となる動物実験との対応がどの程度よいかを調べるバリデーショナル研究が行われる。後者の検討でよく行われるのは、代替法で得られる毒性のスコアと対象となる動物実験で得られる毒性のスコアに関してある種のカットオフ値を事前に定め、得られた結果から2×2分割表を作成して、感度や特異度を調べるというものである。しかし、このような2

値化は得られる情報を失いすぎているのではないだろうか。もしも、バリデーショナル研究を通して代替法と対象となる動物実験との毒性評価のスコア間の関係が明確になり、この関係を想定することが妥当であると考えられるのであれば、代替法を用いた毒性評価において、その関係を積極的に用いるべきであろう。このようなデータの利用法に関する視点は本研究の動機の一つである。

本研究の動機となっているもう一つの視点は、動物実験代替法の開発というからには、対象となる動物実験で評価した場合にどの程度の評価結果が得られるのかということを言及してもよいので

はないだろうかということである。もしも、開発された代替法と対象となる動物実験との毒性評価のスコア間にある程度の関係が想定できるならば、代替法のスコアから対象となる動物実験のスコアを推定することは比較的簡単であるはずである。これを用いて、代替法で得られた毒性のスコアを動物実験の毒性のスコアに換算し、化学物質を評価することは、不自然なことではないであろう。

バリデーション研究は、代替法と対象となる動物実験のスコア間の関係を明らかにする。バリデーション研究によって適切だと認められた代替法を利用する際に、対象となった動物実験を行うことは困難であろうから両者の関係を利用して、動物実験の毒性のスコアを予測することは一つの考えとして成立するようになると思われる。しかしながら、上記の視点から代替法の利用を考えた研究は、著者が知るところでは、まだ行われていない。本研究では、バリデーション研究を通して関係が明らかになった代替法の試験結果として得られる毒性評価のスコアを用いて、動物実験で得られる毒性評価のスコアを予測する統計的方法を構築することを目的とする。

B. 研究方法

B.1. 本研究の想定における具体的な例

具体的には例として、ドレイズ眼刺激性試験の代替法として開発された細胞毒性試験を考える。

化粧品の安全性評価に関して、Draize (1944) により提案されたウサギを用いた眼刺激性試験 (ドレイズ眼刺激性試験) が長い間使用されてきた。この試験法の代替法として、様々な方法の開発が進められている (Eskes ら(2005))。1990年代に、わが国ではいくつかの候補となる眼刺激性試験代替法のバリデーション研究が行われた (Ohno ら (1999))。その結果、いくつかの細胞毒性試験の毒性の指標である EC50 の対数変換した値とド

レイズ眼刺激性試験のスコアである Maximum Averaged Score (MAS) との間にはよい直線的な対応関係があることがわかった。この結果に基づき、Ohno (2004) は代替法を用いた眼刺激性を判定する評価スキームを提案している。この提案では、細胞毒性試験を主とした代替法により被験物質の評価を行う場合には、被験物質とともに同時に 3 つの陽性対照物質 (Tween 20, SLS, Triton X-100) の実験を行い、これらの陽性対照物質での測定値と被験物質の測定値との相対的な関係で刺激の強さ (4 つのカテゴリー) を把握するとしている。

本研究では、このように、代替法を用いて未知の化学物質の毒性を把握する際に、未知の物質と同時に動物実験での毒性のスコアがわかっている複数の物質が陽性対照物質として得られる実験系を想定することにする。

B.2. 提案する方法 (代替法スコアを用いた動物実験スコアの予測方法)

バリデーション研究によって、動物実験の毒性のスコア X と代替法の毒性のスコア Y との関係が直線的な関係であり、

$$y_i = \alpha + \beta x_i + \text{誤差} \quad (1)$$

がよくあてはまっているとする。ここで、誤差は平均が 0、分散が σ^2 の正規分布に従っていると

この代替法を用いて未知の被験物質を評価するとき、同時に 3 つ程度の陽性対照物質 (これらの物質の動物実験のスコアはわかっている) を用いて、実験を行うことになっているものとする。

未知の物質に対して代替法を用いた実験を行い新たに得られた測定値を \hat{y} とする。これと (1) の関係を用いて逆推定によって動物実験の毒性のスコアを得るには

$$\theta = \frac{\hat{y} - \alpha}{\beta} \quad (2)$$

となる θ を求めればよい。

問題は、どのように(2)の α と β を求めるかである。わずかに3物質の同時に実験を行う陽性対照物質の測定値とそれらの動物実験のスコアを用いて回帰直線からこれらの値を求めることにすると、2つのパラメータを3つ測定値で推定することになる。ここで、 α と β の推定値は非常に不安定になるであろう。この問題を解決する一つの方法は、バリデーション研究の結果を事前情報として与えて、ベイズの定理を用いて得られる事後分布の事後平均から α と β を求めることである。このように得られた α と β をここでは α_0 と β_0 として表すことにする。この方法はベイズ回帰として知られており(繁根(1985), Bromeling(1985), Press(1989))、ここまでは昨年のこの研究の成果としても報告している。

ところで、ベイズ統計学の方法では、事後分布という分布が得られるが、上に示した方法では、事後分布の平均のみを用いているので分布の情報は十分に利用できていない。さらにベイズ統計学では、次のデータセットが得られたときにそのデータがどのような分布になるかという予測分布という理論が存在する。そこで、ここでは上記の方法をさらに発展させて、予測分布から θ を求める問題を考えることにする。

詳細は省略するが、もし θ が与えられれば、 \hat{y} の予測分布は自由度 $\nu (=n_0+n-2)$ 、位置母数 $\alpha_0+\beta_0\theta$ 、

尺度母数 $\lambda_0 \left[1 + (1-\theta)(C_0 + X'X)^{-1}(1-\theta)' \right]$ の t 分布となることが知られている(繁根(1985))。ただし、 n_0 は事前情報としていくつ分のデータに相当するかを決める数、 n は同時に実験が行われる陽性対照物質の数、 λ_0 は事前情報であるバリデーション研究と実験を行った陽性対照で回帰をおこなった際の残差平方和に関係する値、 C_0 は事前情報であるバリデーション研究の定数と動物実験デ

ータの平方和行列、 $X'X$ は定数と陽性対照物質の動物実験のデータの平方和行列である。

しかし、ここで想定している問題は、 \hat{y} が実験から得られており、 θ が推定の対象となっている。そこで、最尤法により θ を推定することにする。

$$\hat{y} - \alpha_0 - \beta_0\theta = 0$$

を満たす θ を求めればよいことがわかる。これは、事後平均である α_0 と β_0 を用いて(2)式で θ を推定することに他ならない。したがって、この計算を行う際に予測分布を意識する必要はない。

一方で、予測分布を \hat{y} が t 分布に従っていることを利用すると、この分布が

$$F(\theta) = \frac{(\hat{y} - \alpha_0 - \beta_0\theta)^2}{\lambda_0 \left[1 + (1-\theta)(C_0 + X'X)^{-1}(1-\theta)' \right] \nu}$$

の単調関数であり、これが自由度 $(1, \nu)$ の F 分布に従うことを利用して θ の区間推定を行うことが可能である。その結果、閉じた形で信頼区間を導出することが可能である。

以上が本研究で提案する手法である。

B.3. 提案法を説明するための事例

上記の提案する方法を具体的な数値により説明することにする。Taniら(1999)は、ドレイズ眼刺激性の代替法として、細胞毒性試験であるSIRC-NRとSIRC-CVSのバリデーション研究の結果を報告している。ここではそこで用いられているSIRC-CVSを適用例として用いることにした。Taniら(1999)の研究は、当時実施された厚生労働研究の1次~3次からなる3回のバリデーション研究として実施されたものの一部である。このバリデーション研究では、細胞毒性試験としてHela-MTT、CHL-CV、CornePackも検討され、いずれの試験法もその $\log EC_{50}$ の値が、被験物質の10%溶液でのドレイズ眼刺激性試験の毒性スコアであるMASとがよい直線性を示すことが報告されている(Chibaら(1999), Okumuraら(1999))、

Uchiyama ら(1999))。3 回のバリデーション研究では、それぞれ異なる被験物質が用いられており、参加施設も同一ではない。公開されている Tani ら(1999)、Okumura ら(1999)、Uchiyama ら(1999)の報告では、それぞれ 3 回のバリデーション研究に参加した施設の対応がとれてなく、不明である。しかし、著者が入手した当時提出された厚生科学研究の SIRC-NR と SIRC-CVS の資料にはこの対応関係が明確であった。このため、ここでは Tani ら(1999)のデータを用いることにした。SIRC-NR と SIRC-CVS では、ほぼ同様な結果であり違いがなかったため、この検討では SIRC-CVS を用いたにすぎない。SIRC-CVS では、1 次から 3 回のバリデーション研究に参加している施設は 9 施設(施設 A、B、C、E、F、G、H、I、J) 中 2 施設(施設 A と B)であった。

1 次バリデーション研究では、Ohno (2004) で示されている 3 つの陽性対照物質(Tween 20, SLS, Triton X-100)の実験がそれぞれの施設で行われている。そこで、1 次から 3 次まで参加しているある施設がバリデーション研究には参加していなかったと想定し、陽性対照物質の 3 物質とともに、未知の被験物質をとして残りの物質の実験を行った場合の予測を行うことにした。研究から動物実験の結果である MAS はわかっているので予測の程度を把握することが可能である。

C. 研究結果

C.1. 用いるデータの説明

ここでは、バリデーション研究の結果を示す。MAS の取りうる範囲は 0 から 110 であり、直線関係が現れるのはこの範囲である。そこで、MAS が 0 の物質は除外した。また、Ohno (2004) は細胞毒性試験は、強酸性あるいは強アルカリ性で酸度あるいはアルカリ度が高い物質、及びアルコール等の揮発性物質への適用は確認されていないとし

ていることからこれらを除いた。また Tani ら(1999) で不安定だとされた 1 物質は除いた。この結果 19 物質が 1 次から 3 回のバリデーション研究で得られた物質となる。

図 1 に 9 施設の MAS と $\log(\text{EC50})$ の散布図を示す。

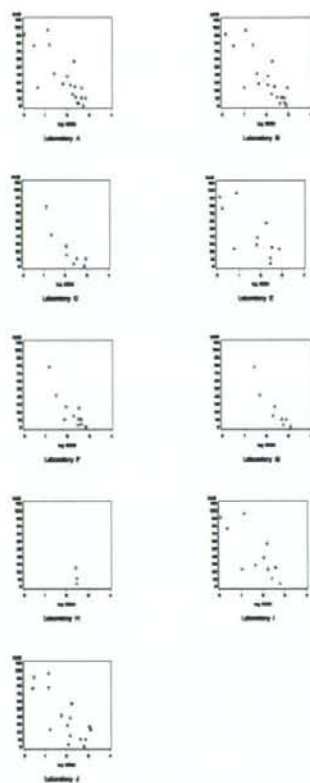


図 1 MAS と $\log(\text{EC50})$ の散布図

以下にデータ解析の例を示すために、施設 A がバリデーション研究に参加していなかったとして、この施設が SIRC-CVS を用いて未知の被験物質の MAS の予測を行うことにする。

施設 A の陽性対照物質に該当する 3 物質の EC50 は表 1 のとおりである。

表1 施設Aの陽性対照のデータ

	MAS	EC50	log EC50
Tween 20	0.7	541	2.73
SLS	15	182	2.26
Triton X-100	41.3	26.7	1.43

C.2. 特定の施設のみにおけるMASの予測

はじめに提案法ではなく、単に表1のデータのみを用いて回帰直線を作成し、その回帰直線からMASを推定した場合を考える。図2は表1の3つのデータに最小二乗法を用いて回帰直線をあてはめた結果である。

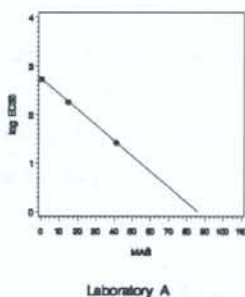


図2 陽性対照のデータを最小二乗法によってあてはめた図

この回帰直線は

$$\log(\text{EC50}) = 2.750 - 0.032 \cdot \text{MAS} \quad (3)$$

を示している。よって、実験によって未知の被験物質を評価した際のMASの予測値は

$$\frac{\log(\text{EC50}) - 2.750}{-0.032} \quad (4)$$

から求めればよい。幸い施設Aではバリデーション研究に参加しているので、陽性対照物質以外の16物質のEC50の値がわかっており、これらの物質のMASもわかっている。そこで16物質からMASを予測した結果を表2に示す。「Simple Pred.」と記載した欄がEC50を用いて(4)式から得られた予測値、「MAS」の欄が実際のMASの値と

なっている。

表2 陽性対照のデータのみを用いたMASの予測

Chemical	log EC50	Simple Pred.	MAS
S1-4	2.52	7.2	3.3
S1-5	2.66	2.9	10.3
S1-6	2.16	18.5	26.7
S1-8	2.84	0.0	10
S1-10	1.21	48.0	78
S2-1	2.40	11.0	11
S2-3	2.36	12.1	25
S2-5	2.48	8.5	4
S3-2	0.65	65.4	23.3
S3-4	0.03	84.7	91.3
S3-5	2.66	2.9	23
S3-6	2.01	23.0	38
S3-7	0.47	71.0	76.7
S3-10	1.83	28.7	28.3
S3-11	1.13	50.5	96.3
S3-14	2.32	13.3	57

C.3. 提案法による予測

次に、同じデータを用いた提案法の結果を示すことにする。表3と図3は施設BからJのデータについて各物質ごとのEC50の平均値を計算した19物質のlog EC50とMASのデータである。このデータを事前情報として用いることにする。

表3 施設BからJのEC50の平均値とMAS

Chemical	MAS	EC50	log EC50
S1-3	0.7	811.8	2.9
S1-4	3.3	330.6	2.47
S1-5	10.3	435.6	2.64
S1-6	26.7	334.36	2.3
S1-7	15	165.2	2.21
S1-8	10	622.3	2.68
S1-9	41.3	40.82	1.59
S1-10	78	19.58	1.27
S2-1	11	292.7	2.47
S2-3	25	310.4	2.49
S2-5	4	452	2.63
S3-2	23.3	10.93	1.01
S3-4	91.3	1.71	0.2
S3-5	23	760.25	2.78
S3-6	38	112.5	2.04
S3-7	76.7	2.43	0.38
S3-10	28.3	67.65	1.8
S3-11	96.3	11.79	1.06
S3-14	57	173.5	2.24

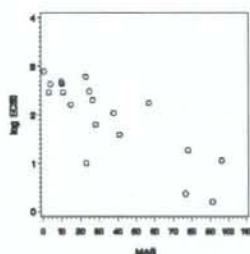


図3 施設BからJのデータから求めたlog EC50とMAS

これらのデータに回帰直線をあてはめると

$$\log(\text{EC50}) = 2.719 - 0.022 \cdot \text{MAS} \quad (5)$$

となる。提案法であるベイズ回帰を利用する場合、はこの回帰係数を事前情報として、表1のデータを用いて回帰式を求めることとなる。先には触れなかったことであるが、ベイズ回帰により得られる回帰係数は、(3)式と(5)式の回帰係数の重み付平均となることが知られている。重みの与え方は任意

であり、それは解析者が決めなくてはならない。

ここでは、どのくらいの物質数が事前情報として寄与しているかという観点から考えることにして解析を行うことにして、2つの解析を行うことにした。1つ目は、事前情報は19物質のデータから得られているので、事前情報と陽性対照物質のデータの比を19:3とするものである。しかし、それではあまりにも事前情報に頼りすぎているかもしれない。そこで、2つ目では、事前情報はデータと同じだけの情報を持っているとして、比を3:3とした。

結果として提案法を用いた回帰式はそれぞれ

(19:3の場合)

$$\log(\text{EC50}) = 2.701 - 0.022 \cdot \text{MAS} \quad (6)$$

(3:3の場合)

$$\log(\text{EC50}) = 2.672 - 0.023 \cdot \text{MAS} \quad (7)$$

であった。これらを用いたMASの予測はそれぞれ

(19:3の場合)

$$\frac{\log(\text{EC50}) - 2.701}{-0.022}$$

(3:3の場合)

$$\frac{\log(\text{EC50}) - 2.672}{-0.023}$$

となる。

表4は提案法から得られたMASの予測値とMASの実測値である。「Bayes Pred.」とした項目が提案法によるMASの予測値となる。この表には比較のためにC.2.で説明した方法も示している。バリデーション研究の結果を事前情報として用い、その事前情報がどのくらいのデータの個数分として勘案するかによって予測値が異なっていることがわかる。

表4 提案法によるMASの予測値とMAS

Chemical	Simple Pred.	Bayes (3:3)	Bayes (19:3)	MAS
S1-4	7.2	6.6	8.2	3.3
S1-5	2.9	0.6	2	10.3
S1-6	18.5	22.2	24.6	26.7
S1-8	0	0	0	10
S1-10	48	62.8	67.3	78
S2-1	11	11.8	13.7	11
S2-3	12.1	13.3	15.3	25
S2-5	8.5	8.4	10.1	4
S3-2	65.4	86.9	92.6	23.3
S3-4	84.7	110	110	91.3
S3-5	2.9	0.6	1.9	23
S3-6	23	28.3	31	38
S3-7	71	94.6	100.7	76.7
S3-10	28.7	36.3	39.4	28.3
S3-11	50.5	66.4	71	96.3
S3-14	13.3	15	17.1	57

表5、表6はそれぞれの提案法の結果とその95%信頼区間を示した。ここでMASが0と110の範囲の値しかとらないため、この範囲を超えたものは0もしくは110としている。

表5 提案法(3:3)の95%信頼区間

Chemical	Bayes (3:3)	95% CI Lower	95% CI Upper	MAS
S1-4	6.6	0	72.4	3.3
S1-5	0.6	0	62.2	10.3
S1-6	22.2	0	106.8	26.7
S1-8	0	0	50.8	10
S1-10	62.8	5.7	110	78
S2-1	11.8	0	82.4	11
S2-3	13.3	0	85.7	25
S2-5	8.4	0	75.7	4
S3-2	86.9	32.2	110	23.3
S3-4	110	54.6	110	91.3
S3-5	0.6	0	62.1	23
S3-6	28.3	0	110	38
S3-7	94.6	39.2	110	76.7
S3-10	36.3	0	110	28.3
S3-11	66.4	10.2	110	96.3
S3-14	15	0	89.4	57

表6 提案法(19:3)の95%信頼区間

Chemical	Bayes (19:3)	95% CI Lower	95% CI Upper	MAS
S1-4	8.2	0	51.3	3.3
S1-5	2	0	44.8	10.3
S1-6	24.6	0	68.7	26.7
S1-8	0	0	36.6	10
S1-10	67.3	24.6	110	78
S2-1	13.7	0	57	11
S2-3	15.3	0	58.7	25
S2-5	10.1	0	53.2	4
S3-2	92.6	49.6	110	23.3
S3-4	110	75.9	110	91.3
S3-5	1.9	0	44.8	23
S3-6	31	0	75.8	38
S3-7	100.7	57.3	110	76.7
S3-10	39.4	0	85.1	28.3
S3-11	71	28.3	110	96.3
S3-14	17.1	0	60.6	57

信頼区間の幅はどちらの場合も広く、このままでは実用することは難しい。

D. 考察

本研究は昨年度からの継続研究である。基本的なアイデアは、細胞毒性試験を用いて眼刺激性のカテゴリーを決めるという Ohno (2004) の提案を拡張し、MAS そのものの値を予測するというものである。この方法論の構築において、昨年度ではまだ理論的に十分に検討されていなかった点を本年度は発展させた。また、具体例を計算するために、昨年度は計算を行うためのプログラムは十分ではなかった。今年度はその点の検討も行き計算方法も発展させている。

本報告では、解析結果を中心に提案法を説明した。そこで、解析結果に基づいて、提案法の考察を行うことにする。提案法を支えている前提の一つは、代替法のスコアと対象となる動物実験のスコアの関係が直線的な関係が成立することである。図1や図3から SIRC-CVS の log EC50 と MAS の間には直線的な関係を想定してもよいようにも

思われるが、いくつかの物質は直線的な関係から外れているようにもみえる。例えば、S3-2は直線関係からはずれている物質であり、これを提案法で予測することは困難である。それでも全体として直線関係が認められるから、このような関係を利用して予測を行うことに関する賛否は、毒性学の専門化との議論が必要がある。

提案法の特徴は、事前情報の利用である。ここでは事前情報を積極的に利用することを考えているが、それは同時対照として用いる陽性対照物質はわずか3物質であり、その3物質で直線を想定することは不安定であると考えからということだけでなく、バリデーション研究によって、その特徴として複数の施設が同一の手順に従った実験の結果が広く利用できるからである。そのようなデータが存在しないところで、事前情報を探すのは困難であるか、何かしらの情報を用いるにしてもそれを適切な事前情報であると肯定することは困難である。したがって、ここで提案する方法は、例えば本報告で示した例の場合には単にSIRC-CVSという細胞毒性試験というのではなく、バリデーション研究で用いられた実験プロトコールに従ったSIRC-CVの実験を行うということが暗黙の前提となっている。

結果例として示したとおり、提案法は事前情報をどの程度の重みで用いるかということについては任意性がある。この検討では3:3と19:3という2通りの適用を試みたが、(6)式と(7)式の回帰係数と(3)式よりも(5)式の回帰係数に近い値となっている。3:3とした(7)式でも(5)式の係数に近い理由は、事後平均が物質数だけの重み付平均ではないことを意味している。これは直感的には次のように説明できる。図4は図2の3つのデータと図3を重ねたものである。つまり、塗りつぶした丸が施設Aでの陽性対照のデータであり、白抜き丸が事前情報としてのデータを示している。提案法

で用いているベイズ回帰は塗りつぶした丸と白抜き丸の重みを変えて回帰直線をあてはめていることにほかならない。図4で明らかのようにMASが大きな値のところに塗りつぶした丸がないために、回帰直線はより白抜き丸の影響を受けることになる。

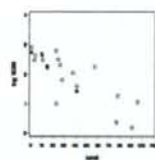


図4 図2のデータと図3を重ねた図

このため3:3であっても事前情報の影響をより強く受けていることになる。陽性対照物質は決まっており、これら3つのMASの値は大きくはないことがわかっているため、物質の個数を事前情報の持つ情報量とするのは必ずしも適切な表現ではないかもしれない、別の基準が必要かもしれない。これは今後の課題である。

例では95%信頼区間を示したが、ここで示した結果を見る限りどちらもその区間は広くこの結果を実際に適用するのはまだ無理がある。表5に比べて表6の信頼区間の方が幅が狭くなっているのは、回帰に用いているデータの数が(3:3)では計6個、(19:3)では計22個として計算しているからである。この結果から考えると、事前情報をより積極的に利用したほうが区間は狭くできる。しかし、当該施設で実験のたびに同時に陽性対照を測定する意義を考えると単に事前情報として用いるデータの個数を多くすることが適切ではないであろう。この解決方法はおそらく2通りある。1つは実験を行うたびに、その施設の陽性対照を事前情報として入れていくことである。こうすることで、少なくとも同時ではなくてもその施設の背景データを組み入れることが可能である。もう1つ

は一回の実験について未知の被験物質は複数回繰り返すことである。この場合、本提案法での推定法はより複雑になることが予想され、この点はさらに検討を続ける余地がある。

提案した方法は、統計学では逆回帰の問題という問題と大きく関係がある。この方法は古くから他の分野で用いられているので、そこでの方法が利用できるかもしれない。他の分野の同様の問題を十分に調査できなかった。これは課題としたい。

ドレイズ眼刺激性試験を例としているが、提案した方法は他試験法にも基本的には利用可能である。ここで使用した例は、国内で実施された眼刺激性試験の代替法であるが、まだその認知度は高くないのが現状のようである。今後、これらが使われ方が検討されていくと思われる。細胞毒性試験に関して、筆者は、実験結果として用量反応曲線（もしくは用量反応関係）を明示することが不可欠であると考えている。その上で、EC50や提案法のような指標を利用し、毒性の評価が行うべきであろう。

E. 結論

本研究では、動物実験代替法の毒性のスコアと対象となる代替法の毒性のスコアの間に直線関係が成立するような場合に、同時実験による代替法で得られる同時陽性対照のスコアとバリデーション研究のような事前情報を用いて、未知被験物質の動物実験のスコアを予測する方法を提案した。動物実験の代替法から動物実験の結果が類推できることが代替法に求められていることであると考えると、動物実験の毒性スコアの予測値を与えることは安全性評価に有用であろう。昨年の課題であった方法論の理論的構築はほぼ確立できたが、事例を通じた検討からは、まだすぐに実用できるわけではないことが明らかになった。事前情報をどの程度取り入れるべきか、どのくらいの繰り返

しを行えば信頼区間がどの程度狭まるかは事例を通して示すことは困難であるので、これらの評価を別に行う必要がある。これらについての検討は今後の課題である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

参考文献

- Bromeling, L.B. *Bayesian analysis of linear models*, Marcel Dekker, 1985.
- Chiba, K., Makino, I., Ohuchi, J., Kasai, Y., Kakishima, H., Tsukumo, K., Uchiyama, T., Miyai, E., Akiyama, J., Okamoto, Y., Kojima, H., Okumura, H., Tsurumi, Y., Usami, M., Katoh, K., Sugiura, S., Kurishita, A., Sunouchi, M., Miyajima, A., Hayashi, M. and Ohno, Y. (1999). Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (9) Evaluation of Cytotoxicity test on HeLa Cells. *Toxicology in Vitro*, 13, 189-198.
- Draize, J. H., Woodard, G. and Calvery, H. O. (1944). Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics*, 82, 377-390.
- Eskes, C., Bessou, S., Bruner, L., Curren, R.,

- Harbell, J., Jones, P., Kreiling, R., Liebsch, M., McNamee, P., Pape, W., Prinsen, M. K., Seidle, T., Vanparys, P., Worth, A. and Zuang, V. (2005). Eye irritation. *ATLA* 33, Suppl. 1, 47-81.
- Ohno, Y., Kaneko, T., Inoue, T., Morikawa, Y., Yoshida, T., Fujii, A., Masuda, M., Ohno, T., Hayashi, M., Momma, J., Uchiyama, T., Chiba, K., Ikeda, N., Imanish, Y., Itakagaki, H., Kakishima, H., Kasai, Y., Kurishita, A., Ohkoshi, K., Okumura, H., Saijyo, K., Sakamoto, K., Suzuki, T., Takano, K., Tatsumi, H., Tani, N., Usami, M. and Watanabe, R. (1999). Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. *Toxicology in Vitro*, 13, 73-98.
- Ohno, Y. (2004). The validation and regulatory acceptance of alternative methods in Japan. *ATLA* 32 Suppl. 1, 643-655.
- Okumura, H., Arhisima, M., Ohuchi, J., Kasai, Y., Tsukumo, K., Kakishima, H., Kotani, M., Kojima, H., Kurishita, A., Hayashi, M., Miyajima, A., Sunouchi, M. and Ohno, Y. (1999). Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (10) Evaluation of Cytotoxicity test on CHL Cells. *Toxicology in Vitro*, 13, 199-208.
- Press, S.J. *Bayesian statistics: principles, models, and applications*. John Wiley & Sons, Inc., 1989.
- Tani, N., Kinoshita, S., Okamoto, Y., Kotani, M., Itagaki, H., Murakami, N., Sugiura, S., Usami, M., Kato, K., Kojima, K., Ohno, T., Saijo, K., Kato, M., Hayashi, M. and Ohno, Y. (1999). Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (8) Evaluation of cytotoxicity tests on SIRC cells. *Toxicology in Vitro*, 13, 175-187.
- Uchiyama, T., Akiyama, J., Miyai, E., Sakamoto, K., Takino, Y., Ohnuma, M., Okumura, H., Sawamura, J., Ikeda, N., Sumida, Y., Chiba, K., Makino, I., Kawakami, K., Yamamoto, R., Torishima, H., Yanase, H., Miyajima, A., Sunouchi, M., Hayashi, M. and Ohno, Y. (1999). Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (7) Evaluation of cytotoxicity tests by CornePack. *Toxicology in Vitro*, 13, 163-173.
- 繁栞算男. *ベイズ統計入門*. 東京大学出版会, 1985.

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

「動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究」

「感作性試験代替法の開発」

分担研究者 大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者 足利太可雄、坂口育、岡本賢二、水野誠、加藤義直、稲葉宏幸、中村恒彰、
佐藤淳、岡本裕子、桑原裕史、小坂七重、蘭さき子

研究要旨

ヒト単球由来の細胞株である THP-1 細胞の CD86 及び CD54 の発現亢進を指標にした感作性試験代替法 (human Cell Line Activation Test: h-CLAT) が日本において開発され、試験法確立に向けた検証が行われている。これまでの検討により、一般の既知化合物に関する in vivo との対応性や、施設間再現性が良好であることが明らかとなってきた。

一方化粧品業界においては近年特に動物実験代替法開発の必要性が高まっていることから、本年度は主に化粧品原料として用いられている化合物を h-CLAT により評価した。その結果本試験法は、今回検討した範囲では化粧品原料の感作性評価に有用であると考えられたが、難溶性物質評価時の分散状態の違いが細胞毒性結果に与える影響など、今後実用化に当たった課題も見出された。

A. 研究目的

感作反応は免疫機能に基づく全身系の反応であり、こうした一連の複雑な反応を in vitro 試験法で置き換えることは非常に困難と考えられてきた。しかし近年の細胞生物学の発展もあり、replacement を目的とした in vitro 試験法として、感作性物質が皮膚に暴露された際に生じるランゲルハンス細胞の変化に着目した試験法がいくつか提案されてきた。我々は、ランゲルハンス細胞の代わりに、ヒト単球細胞株である THP-1 細胞を用いた、表面抗原である CD86 や CD54 の発現亢進を指標とした試験法 (h-CLAT) を開発しその有用性を明らかにしてきた^{1,2,3)}。その後本厚生労働科学研究において、国内 7 施設による共同研究を実施した結果、本試験法は技術移転が容易であり、基本的に施設間再現性が良好であると考えられた⁴⁾。さらに本試験法の汎用性を向上させることを目的として、細胞と血清のロット差及び前培養条件に関する検討^{5,6,7)}や、予測モデル、陽性対照物質 (DNCB) の適用濃度、及び CD86/CD54 発現亢進最小濃度 (EC150, 200) の算出方法の見直

しを行った。

こうした研究結果の蓄積によって本試験法の頑強性や信頼性が向上し、目標としてきた公的バリデーションに必要な知見が整備されてきたと考えられる。一方特に化粧品業界においては、感作性試験代替法の実用化が強く期待されていることから、今年度は化粧品原料に関する h-CLAT の有用性と適用限界を明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

試験方法：細胞は、ヒト単球由来の細胞株である THP-1 細胞を ATCC より購入して使用した。CD86 及び CD54 の発現は、上記の細胞に被験物質を 24 時間処理し、細胞生存率とともにフローサイトメトリーを用いて測定した。細胞株、血清、抗体については標準プロトコールに記載した基準を満たしたものを使用した。適用濃度は、予め予備試験として細胞毒性試験を行い、生存率が 75% に相当する濃度 (CV75 (=IC25) と定義) を基準に、公比 1.2 で 8 濃度 (1.2x, 1x, 1/1.2x, 1/1.2²x,