

表 2 に Ni (100 $\mu$ g/mL) の施設での 3 回の結果を記載した。3 施設ともに 3 回の実験において CD86 及び CD54 が陽性判基準値を超え、すべて陽性と判定された。また 3 施設の平均細胞生存率は 86.0% $\pm$ 2.3 であった。評価結果及び細胞生存率の施設内及び施設間再現性は高かった。

2-2) SLS (50, 55, 60 $\mu$ g/mL) の評価

SLS の 50 $\mu$ g/mL, 55 $\mu$ g/mL, 60 $\mu$ g/mL のそれぞれのデータを、表 3-1, 3-2, 3-3 に記載した。

すべての濃度において、3 施設とも 3 回の実験において陰性の結果が得られ、いずれの濃度においても再現性が確認できた。一方細胞生存率に関しては、施設 2 の 60 $\mu$ g/mL において、3 回の実験中 1 回の実験で 50% を下回る結果が得られた。細胞生存率が 50% 未満の場合、試験は不成立と判断することになっているため、SLS の固定濃度としては、ある程度の毒性が認められるものの、陰性の結果が得られた 55 $\mu$ g/mL が適切な固定濃度と考えられた。

以上の結果から、DNCB の 4.0 $\mu$ g/mL に加え、Ni の 100 $\mu$ g/mL そして SLS の 55 $\mu$ g/mL を細胞の反応性確認時の固定適用濃度として、h-CLAT の最終プロトコールに記載する予定である。

## C-2 細胞培養条件の検討

### C-2-1 イントロダクション

これまで、h-CLAT の試験結果の施設間再現性を高めるために前培養条件や細胞及び血清ロットの選択基準などプロトコールの精緻化に向けた検討を行い、その結果をプロトコールに反映させ実験手法を統一化することで精度の高い h-CLAT 試験法を目指してきた。一方で、より洗練された手法になるにつれ施設間の違いが存在することが明らかとなり、実験者の手技・手法による影響も試験結果に少なからず寄与していることが考えられた。THP-1 細胞は浮遊状態で培養するが、その継代方法についてはプロトコールで規定されていないため施設によって異なる方法、すなわち“遠心分離による方法”と“希釈による方法”の 2 種類の手法で実施されていることが判明した。そして、希釈による方法は遠心による方法に比較して細胞の老廃物や代謝物を多く含む細胞培養液を継代時に多く持ち込むことになり、その結果希釈に

よる方法を繰り返すことで培養液中に老廃物等が蓄積し、長期間培養した場合に細胞の性情に影響を与える可能性が考えられた。そこで、継代方法の違いが h-CLAT の結果に与える影響について検討を行った。

### C-2-2 方法

共同研究に参加している施設の中から、5 施設が本検討に参加した。

各施設では、細胞を播種して約一週間培養した後に、“遠心分離による方法”及び“希釈による方法”の 2 つのラインに分割して継代を行った。“遠心分離による方法”では、細胞培養液及び細胞を培養フラスコより全量回収し、遠心分離により細胞を回収し適切な濃度になるように培養液で希釈し継代した。“希釈による方法”では、細胞培養液及び細胞を培養フラスコより一部回収し、適切な濃度になるように培地で希釈し継代した。

その後、2 つのラインでそれぞれ 8 週目まで継代し、その間に培養前期の細胞として 3 および 4 週目の細胞について、また培養後期の細胞として 8 週目の細胞について、陽性物質の DNCB (4 $\mu$ g/ml)、及び媒体の DMSO を用いて CD86/CD54 の発現量を比較した。

### C-2-3 結果と考察

3 週目および 4 週目の細胞に DNCB を暴露させた場合の CD86/CD54 の RFI 値に対して、8 週目の細胞に DNCB を暴露させた場合の CD86/CD54 の RFI 値の増減を、各施設における変化率 (%) として表 4 に示した。その結果、施設によってその変化の傾向が異なっていた。すなわち、施設 C、D および E では 3 週目または 4 週目から 8 週目への変化率が、CD86 および CD54 のいずれにおいても減少していた。一方、施設 A では 3 週目または 4 週目から 8 週目への変化率が、CD86 においてはいずれも減少していたのに対して、CD54 においては増加していた。また、施設 B では 3 週目または 4 週目から 8 週目への変化率は CD86 および CD54 のいずれにおいても増加していた。

さらに、DNCB に対する反応性を遠心分離による方法と希釈による方法で比較した結果、CD86 および CD54 の発現量に大きな差が認められた。すなわち、施設 B では 3 週目と 4 週目の CD54 発現量が、施設 C では 3 週目の CD86 発現量が、施設 D では 4 週目の CD86 発現量が、施設 E では 3 週目と 4 週目の CD86

発現量が、2つの継代方法で異なる傾向を示した。また、継代方法が異なることでRFI値の増加あるいは減少率が大きく違う場合と、RFI値の変化率の正負が逆となる場合もあった。

このように、DNCRBに対する細胞の反応性が様々な様相を示す原因がどこにあるのかを調べるため、CD86およびCD54の発現量に大きな差が認められた施設B、C、DおよびEにおいて、CD86またはCD54の発現状況をDMSOおよびDNCRBのMFI値で比較した(表5)。その結果、上述の変化率が異なった原因として、施設Bでは遠心分離による方法で継代した細胞にDMSOを暴露させたときのCD54のMFI値が低下したことに起因していることがわかった。また、施設Cでは、4週目及び8週目におけるDMSOのCD86のMFI値が希釈による方法で継代した細胞において高い傾向が認められた。施設Dでは、8週目において希釈による方法で継代した細胞におけるDMSOのCD86のMFI値が顕著に増加しており、結果としてRFI値が減少していたことがわかった。施設Eでは、8週目において希釈による方法で継代した細胞におけるDNCRBのCD86のMFI値が顕著に減少していた。これらのことより、長期培養を行うことでTHP-1細胞の反応性が低下する可能性が見出された。

以上より、長期間の継代培養を行うことでTHP-1細胞のDNCRBに対する反応性やCD86およびCD54の定常発現量に違いが出る可能性が考えられた。一方、遠心分離による方法あるいは希釈による方法の違いが試験結果に影響している可能性も考えられたが、今回の検討では施設間の再現性が得られなかったため明確に結論づけることはできなかった。しかしながら、施設内で継代方法を統一することで試験結果のバラつきを最小限に抑えることは可能であり、細胞培養時にCD54およびCD86の定常発現量を常にモニターすることでh-CLATの高い精度や再現性を得ることができると考えられた。

### C-3 フローサイトメーターの精度管理に関する検討

#### C-3-1 イントロダクション

h-CLATでは、THP-1細胞表面に発現するCD86/CD54の発現量を測定するのに、フローサイトメーターを使用する。そのため、フロ

ーサイトメーターは本試験法には欠かせない重要な精密機器であるが、機種の違い、設定、施設の環境、メンテナンスの状況、測定日などにより、個々の施設で機器の精度が異なることが予想された。そのため、本試験法の信頼性を保証するためにも、フローサイトメーターの精度管理方法の確立は必要であると考えた。そこで、フローサイトメーターの精度管理法を確立することを目的に3施設で検討を行った。

検討には、フローサイトメーターによる抗原定量分析システムである、Dako社製QIFIKIT®を使用した。QIFIKIT®とは、陰性と陽性2種類のピークを検出するためのセットアップビーズと、細胞表面マーカーの発現数を定数化することを使用目的とし、5段階の蛍光強度の異なるビーズにより検量線を作成し発現数を算出するキャリブレーションビーズの二つのビーズセットからなる製品である。本検討は、本キットの本来の目的である定量化を目的としないが、これらセットアップビーズと、キャリブレーションビーズを用いて、各施設の陰性・陽性ピークのずれの確認や、各施設の値のずれを調整可能かどうか検証することとした。

#### C-3-2 方法

検討には、フローサイトメーターによる抗原定量分析システムである、Dako社製QIFIKIT®を使用した。QIFIKIT®とは、陰性と陽性2種類のピークを検出するためのセットアップビーズと、細胞表面マーカーの発現数を定数化することを従来の使用目的とし、5段階の蛍光強度の異なるビーズにより検量線を作成し発現数を算出するキャリブレーションビーズの二つのビーズセットからなる製品である。本検討は、本キットの本来の目的である定量化を目的としないが、これらセットアップビーズと、キャリブレーションビーズを用いて、各施設の陰性・陽性ピークのずれの確認や、各施設の値のずれを調整可能かどうか検証することとした。共同研究に参加している施設の中から、3施設が本検討に参加した。

各施設のフローサイトメーターは同メーカー、同機種であったが、購入年度に違いがある施設もあった。(施設2)QIFIKIT®は、各施設で同ロット品を購入し使用した。

1) h-CLAT設定条件の施設間の差を確認するため、各施設でセットアップビーズお

よびキャリブレーションピーズにより、陰性・陽性のピークの値を測定した。

2) ピークの値を統一するために、セットアップピーズを使い陰性ピークを統一した条件で、セットアップピーズおよびキャリブレーションピーズにより施設間の感度差の確認をした。

3) セットアップピーズの陰性ピークを統一した条件で、DNCB 処理の THP-1 細胞で 3 施設の値を比較した。DNCB の最大濃度を 7.2 $\mu$ g/mL とし、公比 1.2、8 濃度とポジティブコントロールの濃度である 4 $\mu$ g/mL で試験を実施した。

### C-3-3 結果と考察

1) 各施設の h-CLAT の設定条件で、セットアップピーズの蛍光量を測定し、現状の施設間差を確認した。陰性ピークと陽性ピークの比率は、施設 1 と施設 3 はほぼ同様の値であったが、施設 2 は若干低かった (表 6)。これは、施設 2 のみ他の 2 施設より機器の購入時期が 9 年早いと、機器の使用年月が長いほど強い蛍光に対する感度に影響を及ぼしている可能性があると考えられた。ただし、セットアップピーズにより測定した陽性ピークは、通常 h-CLAT で検出する領域よりもかなり高い蛍光領域を測定している。そのため、本試験法の感度調整を行うには、キャリブレーションピーズにより弱い蛍光のピークで比較する方が適当であると考えた。そこで、キャリブレーションピーズで検出された 5 つの陽性ピークのうち蛍光の低い 2 つのピークと、セットアップピーズで測定した陰性ピークとの比率を算出し各施設の値を比較した (表 7)。施設 3 のみピーク 2 と陰性ピークの比率が若干低かったが、3 施設ともほぼ同じ値であった。これより、3 施設の感度はほぼ同様であることが示唆された。

2) 次に、3 施設の陰性ピークを同一設定に揃えることで、陽性ピークの MFI 値を揃えることが可能かどうか検証した。h-CLAT の設定条件で、施設 2 と施設 3 の陰性ピークの MFI 値はほぼ同じであったため、施設 1 でこの値に揃うように設定をし、陽性ピークのデータを比較した (表 8)。陰性ピークを揃えても、陽性ピークの値はほぼ変化せず 3 施設の値に大きな差は認められなかった。

3) 施設 1 の陰性ピークの条件を統一後 (1.78)、DNCB に対する CD86/54 の発現量 (RFI 値) を 3 施設で測定した (図 1)。施

設 1 では、CD86 の方が全体的に発現が強い傾向が認められたが、施設 2 では CD54 の方が発現が強い傾向であった。施設 3 は、他の 2 施設に比べ、全体的に発現が弱く、CD86/CD54 ともに発現量は同等であった。全ての施設で CD86/CD54 ともに陽性となったが、RFI 値は各施設で異なっていた。

以上の結果より、h-CLAT の結果のばらつきは、機器によるものではなく、評価される細胞の違いに起因している可能性が高いことが示唆された。

### D. 結論

今回は、本試験法の信頼性をさらに向上させることを目的として、課題と考えられる 3 つのテーマについて背景データの取得を行った。細胞選択時の対照物質である Ni および SLS については、それぞれの推奨濃度を決定し、プロトコールに記載することができた。細胞継代方法の違いが結果に与える影響については、継代時に細胞を遠心分離するかどうかは結果に大きく影響しないことを明らかにした。測定に用いるフローサイトメーターの精度管理に関する基礎的研究については、検討を行った 3 施設では機器の感度に大きな違いがないことを確認した。

以上の結果より、h-CLAT の試験法としての確立はほぼ終了したと考えられる。今後今回得られた知見を本試験法のバリデーション活動につなげていきたい。

### E. 参考文献

- 1) Ashikaga T., Yoshida Y., Hirota M., Yoneyama K., Itagaki H., Sakaguchi H., Miyazawa Y., Ito Y., Suzuki H., Toyoda H., "Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol", *Toxicology in Vitro*, 20, 767-773, 2006.
- 2) Sakaguchi H., Ashikaga T., Miyazawa Y., Yoshida Y., Ito Y., Yoneyama K., Hirota M., Itagaki H., Toyoda H., Suzuki H., "Development of an in vitro skin sensitization test using human skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT", *Toxicology in Vitro*, 20, 774-784, 2006.

- 3) 足利太可雄, 坂口斉, “ヒト細胞株 (THP-1) を用いた皮膚感作性試験代替法の開発と 2 施設間バリデーション”, フレグランスジャーナル, 8, 108-111, 2004.
  - 4) Ashikaga T., Sakaguchi H., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yamada T., Yoshida M., Ota N., Hasegawa S., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Kosaka N., Sono S and Ohno Y., “Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study”, *AATEX*, **13** (1), 27-35, 2008
  - 5) Kosaka N., Okamoto K., Mizuno M., Yamada T., Yoshida M., Kodama T., Sono S., Ashikaga T., Sato J., Ohta N., Hasegawa S., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H. and Ohno Y., “A study of the criteria for THP-1 cells selection in the human Cell Line Activation Test (h-CLAT): Results of 2<sup>nd</sup> Japanese Inter-laboratory Study”, *AATEX*, **13** (2), 55-62, 2008.
  - 6) Sono S., Yamada T., Kosaka N., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yoshida M., Ota N., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H., Hasegawa S., Ashikaga T. and Ohno Yasuo, “A study on serum difference on test results in the human Cell Line Activation Test (h-CLAT): Results of 3<sup>rd</sup> Japanese inter-laboratory study”, *AATEX*, **13** (2), 63-69, 2008.
  - 7) Mizuno M., Yoshida M., Kodama T., Kosaka N., Okamoto K., Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Ashikaga T., Kuwahara H., Sakaguchi H., Sato J., Ota N., Okamoto Y. and Ohno Y., “Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results: Results of the 4<sup>th</sup> Japanese inter-laboratory Study”, *AATEX*, **13** (2), 70-82, 2008
  - skin sensitization potential using h-CLAT”, in submitting.
  - 9) Okamoto K., Kato Y., Kosaka N., Mizuno M., Inaba H., Sono S., Ashikaga T., Nakamura T., Okamoto Y., Sakaguchi H., Kishi M., Kuwahara H., and Ohno, Y., “Results of a Japanese ring study of human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization (6th Report): A Study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT”, in submitting.
  - 10) Sono S., Mizuno M., Kosaka N., Okamoto K., Kato Y., Inaba H., Nakamura T., Kishi M., Kuwahara H., Sakaguchi H., Okamoto Y., Ashikaga T. and Ohno, Y., “Results of a Japanese ring study of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th Report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials”, in submitting.
2. 学会発表 (以下全て JaCVAM 第3回ワークショップにおける講演発表)
- 1) 坂口斉 “試験の原理と概要”
  - 2) 足利太可雄 “具体的試験法”
  - 3) 太田尚子 “施設間再現性”
  - 4) 岡本賢二 “細胞選択条件”
  - 5) 藺さき子 “血清選択条件”
  - 6) 中村恒彰 “細胞培養条件”
  - 7) 水野 誠 “香料の評価”
  - 8) 小坂七重 “防腐剤の評価”
  - 9) 加藤義直 “染毛剤の評価”
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

#### F. 研究発表

##### 論文発表

- 8) Kosaka N., Inaba H., Okamoto K., Mizuno M., Sono S., Kato Y., Kishi M., Ashikaga T., Okamoto Y., Kuwahara H., Nakamura T., Sakaguchi H., and Ohno, Y. 11. “Results of the Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (5th Report): A study for evaluating preservative

表1 1施設でのNiとSLSに関する固定濃度での評価

施設	評価	Ni	SLS
施設	ポイント	100.0	50.0
1	CD86 RFI	139	66
	CD54 RFI	872	100
	細胞生存率	63.3	96.8
2	CD86 RFI	132	72
	CD54 RFI	100	103
	細胞生存率	81.4	92.5
3	CD86 RFI	125	73
	CD54 RFI	659	100
	細胞生存率	81.4	92.4
4	CD86 RFI	167	70
	CD54 RFI	180	88
	細胞生存率	72.5	93.4
5	CD86 RFI	126	66
	CD54 RFI	651	100
	細胞生存率	81.4	92.0
6	CD86 RFI	725	91
	CD54 RFI	617	80.2
	細胞生存率	61.7	92.7
7	CD86 RFI	213	61
	CD54 RFI	825	87
	細胞生存率	72.7	92.9
8	CD86 RFI	158	61
	CD54 RFI	591	100
	細胞生存率	66.4	95.3
9	CD86 RFI	182	68
	CD54 RFI	484	100
	細胞生存率	85.1	93.5
10	CD86 RFI	191	75
	CD54 RFI	1064	99
	細胞生存率	85.9	94.2

表2

Ni 100 µg/ml	CD86 RFI	CD54 RFI	Cell viability
施設1	158	591	86
	153	484	85
	191	1064	86
施設2	241	741	84
	283	812	82
	260	587	86
施設3	246	1269	87
	268	848	87
	276	1222	90

表4 継代細胞へのDNCB暴露によるRFI値(CD86/CD54)の増減

施設	3週目から4週目への変化率(%)		4週目から5週目への変化率(%)	
	濃心分画法	希釈法	濃心分画法	希釈法
施設A	-24%	-20%	-15%	-2%
	(108-233)	(108-243)	(287-233)	(237-243)
施設B	+10%	+32%	+21%	+1%
	(271-405)	(383-407)	(338-406)	(368-447)
施設C	+10%	+43%	+54%	+5%
	(279-304)	(272-383)	(329-306)	(210-368)
施設D	+6%	-21%	-28%	+1%
	(613-875)	(498-393)	(283-875)	(355-103)
施設E	-50%	-3%	-37%	-1%
	(849-322)	(414-375)	(514-322)	(49-375)
施設F	+1%	+5%	-7%	-4%
	(585-309)	(374-318)	(331-306)	(332-318)
施設G	-21%	-11%	-3%	-4%
	(583-444)	(283-292)	(451-446)	(457-352)
施設H	+24%	+8%	+9%	-6%
	(1182-788)	(850-322)	(1208-768)	(810-322)
施設I	5%	-31%	-24%	-54%
	(370-355)	(354-223)	(461-355)	(460-223)
施設J	-12%	-3%	-10%	-2%
	(299-245)	(210-100)	(278-271)	(271-200)

表3-1

SLS 50 µg/ml	CD86 RFI	CD54 RFI	Cell viability
施設1	68	103	95
	62	96	94
	85	98	94
施設2	115	116	82
	104	167	78
	117	150	83
施設3	70	136	94
	67	115	92
	62	61	90

表3-2

SLS 55 µg/ml	CD86 RFI	CD54 RFI	Cell viability
施設1	61	103	91
	48	108	83
	75	111	89
施設2	113	114	73
	94	183	59
	104	163	69
施設3	55	144	85
	73	143	86
	90	192	88

表3-3

SLS 60 µg/ml	CD86 RFI	CD54 RFI	Cell viability
施設1	44	100	77
	38	118	67
	55	109	77
施設2	92	155	57
	46	176	41
	104	179	51
施設3	40	164	74
	44	188	70
	72	150	75

表5 CD86/CD54の発現量に差が認められた施設でのMFI値の比較

施設	DMSO	3週目		4週目		5週目	
		濃心分画法	希釈法	濃心分画法	希釈法	濃心分画法	希釈法
施設B	DMSO	5.7	5.63	7.58	7.11	8.80	5.95
	DNCB	16.84	13.75	14.69	14.53	12.64	11.6
施設C	DMSO	4.22	5.05	3.80	4.88	6.09	8.40
	DNCB	13.74	13.44	11.01	14.38	20.82	25.05
施設D	DMSO	7.18	8.55	6.80	7.42	9.50	18.11
	DNCB	25.11	18.02	20.7	22.28	30.49	40.11
施設E	DMSO	2.46	4.55	7.04	7.7	9.23	9.58
	DNCB	13.36	17.00	24.44	28.15	27.6	18.53

表6 セットアップピーズによる各施設の陰性ピークおよび陽性ピークのMFI値とその比率

	施設1	施設2	施設3
陰性ピーク	1.55	1.78	1.79
陽性ピーク	723.39	610.99	853.26
陽性/陰性	466.7	343.25	476.68

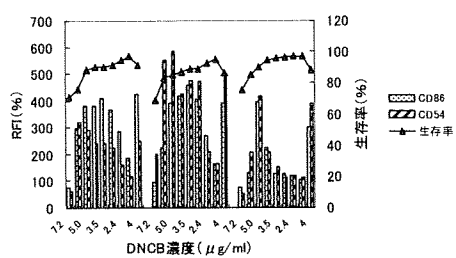
表7 キャリブレーションピーズによる  
低蛍光領域での2つのピークのMFI値と  
陰性ピークとの比率

	施設1	施設2	施設3
陰性ピーク	1.56	1.78	1.79
ピーク1	5.3	6.29	5.75
ピーク2	22.93	25.94	25.02
ピーク1/陰性	3.42	3.53	3.21
ピーク2/陰性	14.79	14.57	13.98

表8

	施設1	施設2	施設3
陰性ピーク	1.55	1.78	1.79
ピーク1	5.3	6.26	5.75
ピーク2	22.93	26.98	25.02
ピーク1/陰性	3.42	3.52	3.21
ピーク2/陰性	14.79	15.16	13.98

図1 DNCBに対する各施設でのCD86/CD54の発現量比較



## 分担研究報告書

### 「ヒト接触皮膚炎評価の見直し」

研究分担者 松永佳世子 藤田保健衛生大学医学部皮膚科

#### 研究要旨

【背景と目的】現在、化粧品や医薬部外品の皮膚一次刺激のパッチテストによる評価は、医療機関では主に 48 時間貼布により、企業では主に 24 時間貼布で行われている。48 時間貼布と 24 時間貼布について比較評価した報告はない。一方、OECD 等で一次刺激性評価法としては 4 時間貼布が検討されている。本年度の研究としては、日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 皮膚刺激研究グループで行った一次刺激性評価のためのパッチテスト貼布時間の検討を報告する。【方法】試験試料は、一次刺激性物質としてパッチテストや動物試験にて刺激性が有るとされている物質及び化粧品原料として汎用されている物質を用いた。被験者はテスト実施部位（背部）に異常所見のない者とした。貼布部位は上背部傍脊椎部として、左背部に 48 時間貼布、右背部に 24 時間貼布、両側の上記貼布物質の下部に 4 時間貼布を施行した。判定は皮膚刺激判定用新基準を用いた。すべて同時に評価できるように、貼布時間を調整した。【結果】4 時間貼布では、皮膚刺激反応を惹起することはできなかった。24 時間および 48 時間貼布の皮膚刺激反応には差は認めなかった。

【結論】皮膚一次刺激性のパッチテストによる評価は、24 時間貼布及び 48 時間貼布の何れでも可能である。

#### A. 研究目的

現在、化粧品や医薬部外品の皮膚一次刺激のパッチテストによる評価は、医療機関では主に 48 時間貼布により、企業では主に 24 時間貼布で行われている。しかし、本邦で一次刺激性の評価法として 48 時間貼布と 24 時間貼布について比較評価した報告はなく、また現在 OECD 等で一次刺激性評価法としては 4 時間貼布が検討されている。従って、皮膚刺激性を捉えるための最適な予知パッチ貼布時間を検討する必要があると考えられた。

皮膚一次刺激のクローズドパッチテストによる評価法として、48 時間貼布、24 時間貼布及び 4 時間貼布について、界面活性剤・保湿剤・殺菌剤・油剤を用いて被験物質の一次刺激性を捉えるための最適な予知パッ

チ貼布時間を検討した。また、皮膚刺激性を評価するために、より細かな皮膚反応を比較評価が可能な皮膚刺激判定用新基準を用いて評価した。

#### B. 研究方法

被験者はテスト実施部位（背部）に異常所見のない者とした。アトピー素因を有するものも可とした。除外対象者としてはステロイド外用あるいは内服している者、本試験の試験試料にアレルギーを有する者。本試験試料に対して、易被刺激性が既知である者とした。

試験試料は、一次刺激性物質としてパッチテストや動物試験にて刺激性が有るとされている物質及び化粧品原料として汎用されている物質を用いた。アニオン系界面活性剤であるラウリル硫酸ナトリウム（0.5%、

0.3%、0.1%水溶液)、保湿剤であるプロピレングリコール(50%、30%水溶液)、脂肪酸石鹼であるラウリン酸ナトリウム(2%、1%水溶液)、油剤であるミリスチン酸イソプロピル(100%)、カチオン界面活性剤である塩化ベンザルコニウム(0.10%、0.05%水溶液)、ノニオン界面活性剤であるポリオキシエチレン(10モル)オレイルエーテル(10%、5%水溶液)、およびこれらの基剤である白色ワセリン、蒸留水、生理食塩水を100%で貼布した。

貼布部位は上背部傍脊椎部として、左背部に48時間貼布、右背部に24時間貼布、両側の上記貼布物質の下部に4時間貼布を施行した。すべて同時に評価できるように、貼布時間を調整した。

判定は皮膚刺激判定用新基準を用いた。

### C. 研究結果

その結果、図1に示すように4時間貼布では、皮膚刺激反応を惹起することはできなかった。24時間および48時間貼布の皮膚刺激反応には差は認めなかった。

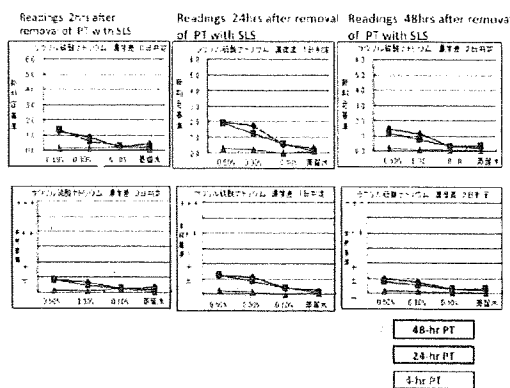


図1. 貼布4時間、24時間、48時間の皮膚刺激反応の差

1. 刺激性が認められる成分では、24時間貼付及び48時間貼布は刺激性が評価可能であったが、4時間貼布では刺激反応の発生は少なかった。
2. 48時間貼布・24時間貼布・4時間貼布の3群間では刺激反応の出現率に有意差( $\chi^2$  n×m検定)が認められた。一方、48時間貼布・24時間貼布の2群では、刺激反応の出

現率に有意差( $\chi^2$  n×m検定)は認められなかった。

3. 刺激反応の判定は、48時間貼布・24時間貼布では試料除去後0日、1日が刺激反応のピークとなっており、2日判定では低減していた。

4. 48時間貼布では補強用の絆創膏(サージカルテープ)によるカブレの発生が多かった。

5. 「新判定基準」は「本邦基準」より被験物質の刺激性の差を検出し易い結果を得た。

### E. 結論

皮膚一次刺激性のパッチテストによる評価は、24時間貼布及び48時間貼布の何れでも可能である。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表(平成21年度)

#### 論文発表

- 1) 矢上晶子, 松永佳世子: 日用品による接触皮膚炎、アレルギー・免疫16: 1344-6932, 2009
- 2) 田中紅, 稲葉弥寿子, 中川真実子, 鈴木加余子, 松永佳世子: イソステアリン酸グリセリルによる接触口唇炎の1例. J Environ Dermatology & Cuban Allegro 3:163-169, 2009
- 3) 中川真実子, 松永佳世子: アロマオイルが原因の湿疹遷延例. J Visual Dermatology 8:468-469, 2009
- 4) 佐野晶代, 矢上晶子, 山北高志, 中川真実子, 井上智子, 鈴木加余子, 松永佳世子: 2006年に当科で化粧品による接触皮膚炎を疑いパッチテストを行った症例のまとめ. J Environ Dermatol & Cutan Allergol 3:94-100, 2009



- 5) 松永佳世子, 矢上晶子: 接触皮膚炎の臨床症状と検査. アレルギー・免疫 16: 20-26, 2009
- 6) 松永佳世子: 接触皮膚炎. 皮膚臨床 51: 特: 49: 1323-1331, 2009
- 7) 松永佳世子: 疾患別: アレルギー診療のポイント 接触皮膚炎. medicina 47: 272-275, 2010

学会発表

- 1) 田中 紅, 中川真実子, 稲葉弥寿子, 廣川景子, 安部正通, 山北高志, 鈴木加余子, 松永佳世子: 化粧品による接触皮膚炎を疑いパッチテストを行った症例2008年のまとめ. 第34回日本化粧品学会 東京 2009年6月11日12日
- 2) 伊藤正俊, 関東裕美, 鷺崎久美子, 松永佳世子, 矢上晶子, 中川真実子, 加藤則人, 河合敬一, 滝脇弘嗣, 吉村 功, 小島 肇: パッチテストによる皮膚一次刺激性評価(2). 第39回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 京都 2009年11月6日-8日
- 3) Kayoko Matsunaga: International Workshop on Skin Safety Evaluation of Cosmetics and Chemicals: From Genetics, Alternatives and Human Testing Japanese collaboration on human patch testing. The 17th International Contact Dermatitis Symposium and the 11th Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium Kyoto International Conference Center Nov 5-8 2009
- 4) Hajime Kojima, Masafumi Iijima, Kayoko Matsunaga, Hitoshi Sasa, Hiroshi Itagaki, Yuko Okamoto, Nohiro Nishiyama, Hiroshi Onodera, Iku Mita, Jun Washida, Koichi Masuyama, Mitsuteru Masuda, Yasuo Ohno: International Workshop on Skin Safety Evaluation of Cosmetics and Chemicals: From Genetics, Alternatives and Human Testing Utilization of an alternative to

animal testing for safety evaluation of cosmetic ingredients using Quasi-drug. The 17th International Contact Dermatitis Symposium and the 11th Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium Kyoto International Conference Center Nov 5-8 2009

- 5) Tamie Suzuki, Shoko Matsukuma, Akiko Yagami, Mamiko Nakagawa, Kayoko Matsunaga: Benefits of a topical moisturizer containing a novel oligomer ester for barrier-damaged skin. The 17th International Contact Dermatitis Symposium and the 11th Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium Kyoto International Conference Center Nov 5-8 2009
- 6) Beni Tanaka, Mamiko Nakagawa, Yasuko Inaba, Keiko Hirokawa, Kayoko Suzuki, Akiko Yagami, Kayoko Matsunaga: Patch test results of cosmetics and related allergens over the 3 years from 2006 to 2008 at the Department of Dermatology, Fujita Health University Hospital. The 17th International Contact Dermatitis Symposium and the 11th Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium Kyoto International Conference Center Nov 5-8 2009
- 7) 伊佐見真実子, 矢上晶子, 亀山梨奈, 美浦麻衣子, 稲葉弥寿子, 松永佳世子: 眼瞼の接触皮膚炎を疑いパッチテストを行った症例のまとめ. 第251回日本皮膚科学会東海地方会 名古屋市, 2010年3月7日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

•

## 分担研究報告書

### 「バリデーショナルデータの統計解析」

研究分担者 大森 崇 京都大学大学院

#### 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、一昨年度、昨年度に引き続き統計的なアプローチによる予測方法を構築することを目的としている。基本的な考え方は、昨年度までに提示した。本年度は、提案する方法の理論をより明確にすること、計算方法を提示すること、対象となる動物実験の精度について検討を行うことを目的とする。

**[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。統計的較正法の観点から提案法を導出することにした。また、バリデーショナル研究で用いられたドレイズ眼刺激性試験の各個体のデータを入手し、ドレイズ眼刺激性試験の刺激性のスコアであるMASの標準誤差をモデルを用いて推定することにした。

**[結果]** ベイズ統計学の視点から統計的較正法を適用し、提案法を導いた。その結果は、予測値は昨年度導いたものと同じになることを示した。MASの標準誤差は、MASが5のときは少なくとも1程度、10では少なくとも2程度の大きさがあることを考慮すべきであることがわかった。

**[結論]** 代替法を用いて動物実験のスコアを予測を行う際、予測が適切に行えているかどうかの評価には対象となる動物実験のスコアがどの程度ばらつきも考慮する必要がある。

#### A. 研究目的

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国際的に進められており、多くの試験法についてバリデーショナル研究が行われている。バリデーショナル研究では、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ことがよく行われる。しかし、このような2値化は得られる情報を損失の問題やカットオフ値が適切ではないための誤分

類の問題はあまり認識されていないようである。

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は、その関係を積極的に用いるべきではないだろうか。もしも代替法で得られる結果から、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を予測できるならば、毒性の強さに言及することができる。これは化学物質の安全性評価に有益な情報をもたらすであろう。

そこで、本研究では、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場合に、代替法のスコアから対象となる動物実験のスコアを予測する統計的方法の構築することを目的としている。

昨年までに、おおよその方法論は構築できた。本研究で検討している方法が統計的較正法として知られている方法の枠組みで捕らえることができることから、本年度は、この研究で発展させた方法論を統計的較正法として提案法を整理し導出することにする。これにより、昨年度までの本研究の提案は2つの段階での統計的推測方法が統一されていなかった点を、ベイズ統計学と呼ばれる理論体系の下で構築可能である。さらに、構築した方法論の計算が通常の統計解析ソフトウェアを用いて計算できることを示す。また、研究を進める中で、得られた結果の解釈には対象としている動物実験のスコアの精度にも注意すべきであることが重要であることがわかったため、具体的な例に関して、スコアの精度について言及する。

## B. 研究方法

### B.1 本研究が想定している具体的な例

本研究では、具体的には例として、ドレイズ眼刺激性試験 (Draize 1944) の代替法として開発された細胞毒性試験を考える。

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同時に実験されるような実験系を想定することにする。

### B.2 統計的較正法

統計的較正法は、較正段階と予測段階の2段階からなる。較正段階では、 $n$ 組の未知被験物質からなる参照物質の実験の値( $[x_1, y_{11}], \dots, [x_n,$

$y_{1n}]$ )から、回帰式

$$y_{ii} = \alpha + \beta x_i + \varepsilon_{ii} \quad (1)$$

を構成する。本研究において、具体的に想定する例では  $x_i$  はドレイズ眼刺激性試験のスコアである Maximum Average Score (MAS)の値であり、 $y_{ii}$  は対数変換を施した  $IC_{50}$  である。 $\varepsilon_{ii}$  は互いに独立で同時に  $N(0, \sigma^2)$  に従う誤差であり、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\sigma^2$  は未知のパラメータである。つまり、較正段階では、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\sigma^2$  を推定することが目的となる。予測段階では、未知の被験物質の  $IC_{50}$  の値である  $y_2$  と回帰式に基づきえられたパラメータの推定値から被験物質の MAS である  $\theta$  を予測する。

統計的較正法は、2種類の予測値が提案されている。ひとつは古典的推定量というもので、この方法では、

$$\hat{\theta}_c = \frac{y_2 - \hat{\alpha}}{\hat{\beta}} \quad (2)$$

として  $\theta$  を予測する。ここで、 $\hat{\alpha}$  と  $\hat{\beta}$  は  $\alpha$  と  $\beta$  の推定値である。

一方、逆推定量と呼ばれるものは、

$$x_i = \gamma + \delta y_{ii} + \varepsilon'_{ii} \quad (3)$$

として較正段階を構築し、予測段階では  $\gamma$  と  $\delta$  の推定値である  $\hat{\gamma}$  と  $\hat{\delta}$  を用いて

$$\hat{\theta}_1 = \hat{\gamma} + \hat{\delta} y_2$$

というようにして、 $\theta$  を予測する。

### B.3 提案法の考え方

2つの推定方法に関して、統計的性能は一長一短がある。本研究では、測定値についてモデル化を行う古典的推定法で考えたモデルでモデル化で行ってきた。従来の古典的方法と本研究での違いは、較正段階で用いるデータが陽性対照物質を用いるために、その数は限られることである。この研究では、そのような同時対照は3物質程度であるという前提がある。わずか、3物質程度で2つのパラメータの値を推定すると、不安定であると考えら

れる。また、バリデーション研究が行われていれば、事前情報を作るだけの十分な背景情報が存在することになる。そこで、本研究ではバリデーション研究による背景データが存在するということを前提として、このような事前情報を積極的に用いるベイズ統計学における回帰分析の方法を用いる。このように得られた $\alpha$ と $\beta$ をここでは $\alpha_*$ と $\beta_*$ として表すことにする。この方法はベイズ回帰として広く知られている（繁耕（1985）, Bromeling（1985）, Press（1989））。ベイズ統計の枠組みで、 $\alpha_*$ と $\beta_*$ を用いた古典的推定量の $\theta$ が、理論的に導出できることがわかった。その導出を結果に示す。

#### B.4 提案法の計算方法

ベイズ統計学の方法は、しばしば積分計算などが必要となる。しかし、バリデーション研究で、個々の物質についてのデータが公開されているならば、通常回帰分析のソフトウェアで計算が可能である。その方法を結果に示す。

#### B.5 動物実験のスコアの精度

本研究で、検討する事例として用いているドレイズ眼刺激性試験の刺激性のスコア MAS は 3 個体から計算される 0 から 110 の間の値である。スコアの特徴から 0 や 110 付近は測定誤差が小さくなるためばらつきが小さく、一方で、55 付近では大きくなることが予測される。Ohno(1999)はこのスコアの標準偏差を示し、2 次曲線をあてはめている。ここでは、得られたデータというよりは、結果の解釈について MAS の精度を議論したいため、0 と 110 ではばらつきは 0 とし、55 でのばらつきが最大になるように標準誤差に 2 次曲線をあてはめることにする。これは

$$SE = a \times (MAS^2 - 110 \times MAS)$$

という形でモデル化できるので、データにこの式をあてはめることにした。

オリジナルのデータは、許可を得て使用した。

### C. 研究結果

#### C.1 提案法の導出

提案法は、較正段階でベイズ回帰を用いる。この段階で、(1)式による回帰係数  $\beta = (\alpha \ \beta)'$  の事後平均と予測分布を計算する。

#### 尤度

$n$  組の陽性対照物質の代替法のスコア（例えば IC50）、 $y_1 = (y_1, y_2, \dots, y_n)'$  と、定数と動物実験のスコア（例えば MAS）からなるデザイン行列

$$X = \begin{pmatrix} 1 & x_1 \\ 1 & x_2 \\ \vdots & \vdots \\ 1 & x_n \end{pmatrix}$$

を考える。バリデーション研究から、両者のスコアの間に関係が示されているとする。誤差が独立に同一の平均が 0 となる正規分布に従うという仮定の下で、尤度は

$$\begin{aligned} p(y_1 | X, \beta, \sigma^2) &= (2\pi\sigma^2)^{-n} \exp\left(-\frac{1}{2\sigma^2} (y_1 - X\beta)' (y_1 - X\beta)\right) \\ &= (2\pi\sigma^2)^{-n} \exp\left(-\frac{1}{2\sigma^2} \left(S^2 + (\beta - \hat{\beta})' X' X (\beta - \hat{\beta})\right)\right) \end{aligned}$$

である。ただし、 $\hat{\beta} = (X' X)^{-1} X' y_1$  で、 $S^2 = (y_1 - X\hat{\beta})' (y_1 - X\hat{\beta})$  である。

#### 事前分布

$\beta$  と  $\sigma^2$  に対して事前分布が、自然共役事前分布  $p(\beta, \sigma^2)$

$$\propto (\sigma^2)^{-\frac{n_0}{2}-1} \exp\left(-\frac{1}{2\sigma^2} \left[\lambda_0 + (\beta - \beta_0)' C_0 (\beta - \beta_0)\right]\right)$$

を想定する。ここで、 $n_0$ ,  $\lambda_0$ ,  $C_0$ ,  $\beta_0 = (\alpha_0, \beta_0)'$  は、事前の知識を反映させたパラメータであり、具体的には、バリデーション研究の結果などから、これらを得ることができる。

上記の尤度と事前分布から、事後分布は

$$\begin{aligned}
& p(\beta, \sigma^2 | y_1, X_1) \propto p(\beta, \sigma^2) p(y_1 | X, \beta, \sigma^2) \\
& \propto (\sigma^2)^{\frac{n_0+n}{2}-1} \exp\left(-\frac{1}{2\sigma^2} \left[ \lambda_0 + S^2 + (\beta - \beta_0)' C_0 (\beta - \beta_0) + (\beta - \hat{\beta})' X' X (\beta - \hat{\beta}) \right]\right) \\
& = (\sigma^2)^{\frac{n_0+n}{2}-1} \exp\left(-\frac{1}{2\sigma^2} \left[ \lambda_* + (\beta - \beta_*)' (C_0 + X' X) (\beta - \beta_*) \right]\right)
\end{aligned}$$

となる。ただし、

$$\lambda_* = \lambda_0 + S^2 + (\beta_0 - \beta_*)' C_0 (C_0 + X' X)^{-1} X' X (\beta_0 - \beta_*)$$

で

$$\beta_* = (C_0 + X' X)^{-1} (C_0 \beta_0 + X' X \hat{\beta})$$

である。

未知の被験物質に対する代替法のスコアを  $y_2$  とする。また、予測したい動物実験のスコアを  $\theta$  とする。 $\theta$  を与えたときの  $y_2$  の予測分布は、

$$\begin{aligned}
& p(y_2 | \theta, y_1, X) \\
& \propto \iint p(y_2 | \theta, \beta, \sigma^2) p(\beta, \sigma^2 | y_1, X) d\beta d\sigma^2 \\
& \propto \left[ \lambda_* + \frac{(y_2 - (\alpha_* + \beta_* \theta))^2}{1 + (1 \ \theta) (C_0 + X' X)^{-1} (1 \ \theta)'} \right]^{-\frac{v+1}{2}}
\end{aligned}$$

となる。ただし  $v = n_0 + n - p - 1$  である。つまり、 $y_2$  は自由度が  $v$ 、位置パラメータが  $\alpha_* + \beta_* \theta$ 、尺度パラメータが

$$\lambda_* \left[ 1 + (1 \ \theta) (C_0 + X' X)^{-1} (1 \ \theta)' \right]$$

の  $t$  分布に従う。

予測段階として、 $\theta$  を予測するためにこの事後分布  $p(\theta | y_1, y_2, X_1)$  を考えることにする。ベイズの定理より

$$\begin{aligned}
p(\theta | y_1, y_2, X) & \propto p(y_2 | y_1, \theta, X) p(\theta | y_1, X) \\
& = p(y_2 | y_1, \theta, X) p(\theta)
\end{aligned}$$

である。校正段階の回帰係数とは異なり、 $\theta$  の事前情報はない。そこで、これが定数であるとする。この仮定を置いた場合、 $\theta$  の事後分布について推測を行うことは、尤度にもとづき  $\theta$  についての推測を行うことになる。この尤度は先に求めた予測分布に他ならない。そして、この尤度を最大にするためには、

$$y_2 - (\alpha_* + \beta_* \theta) = 0$$

を解けばよいことがわかる。つまり、提案法の推定値は、

$$\hat{\theta} = \frac{y_2 - \alpha_*}{\beta_*}$$

である。

以上の結果をまとめると、提案法における・推定は、古典的推定量をベイズ回帰により求めた回帰係数を使って計算すればよいことになる。

## C.2 提案法の計算方法

先に示したように、提案法における未知物質の動物実験のスコア  $\theta$  は事後平均  $\beta_* = (\alpha_*, \beta_*)'$  を  $(C_0 + X' X)^{-1} (C_0 \beta_0 + X' X \hat{\beta})$  から求め、実験から得た  $y_2$  を用いて、

$$\hat{\theta} = \frac{y_2 - \alpha_*}{\beta_*}$$

から求めればよい。それぞれがわかっていれば、この式を構成することは難しくはないので、応用を考えると回帰係数の事後平均が簡単に求めることができればよいことになる。

バリデーション研究では、研究に用いられた代替法でのスコアや動物実験のスコアが個々の物質ごとに公開されていることが多い。そのようなデータが利用できるとする。バリデーション研究で得られた代替法のスコアの値のベクトルを

$$y_0 = (y_{01}, y_{02}, \dots, y_{0n_0})'$$

とした動物実験のスコアからなる計画行列を

$$X_0 = \begin{pmatrix} 1 & x_{01} \\ 1 & x_{02} \\ \vdots & \vdots \\ 1 & x_{0n} \end{pmatrix}$$

とする。そして、個々の測定値にかかる適当な重みを

$$W_0 = \begin{pmatrix} w_{01} & 0 & \dots & 0 \\ 0 & w_{02} & & 0 \\ \vdots & & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & w_{0n_0} \end{pmatrix}$$

とする。このバリデーション研究のデータセットと、未知の物質を評価するためある施設であらたに実施された実験で得られた同時陽性対照物質のデータ  $y_1$  と  $X$  と合わせたデータセットを

$$y = \begin{pmatrix} y_0 \\ y_1 \end{pmatrix}, \quad X = \begin{pmatrix} X_0 \\ X \end{pmatrix}$$

とする。また、重みを

$$W = \begin{pmatrix} W_0 & 0 \\ 0 & I \end{pmatrix}$$

とする。このデータに関して、重み付最小二乗法で求めた回帰係数  $\beta = (\alpha, \beta)'$  の推定値は

$$\begin{aligned} & (X'WX)^{-1} X'Wy \\ & = (X_0'W_0X_0 + X'X)^{-1} (X_0'W_0X_0\beta_0 + X'X\hat{\beta}) \end{aligned}$$

となる。ここで  $C_0 = X_0'W_0X_0$  と置けば、これは事後平均に他ならない。つまり、提案法は重み付最小二乗法を計算できればよいことになる。重み付け最小二乗法は、通常の統計解析ソフトで簡単に計算可能である。このため、提案法による毒性試験法の予測値を得るために、新たなソフトウェアやプログラムを開発する必要はない。

### C.3 動物実験のスコアの精度

図 1 は、バリデーション研究で得られたドレイズ眼刺激性試験の MAS を横軸に、MAS の計算で用いた 3 個体の総合点の標準誤差を示している。

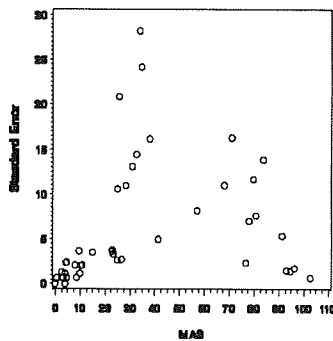


図 1 MAS の SE と MAS

図 2 は図 1 のデータに最小二乗法を用いて、1 パラメータの 2 次曲線をあてはめた結果である。

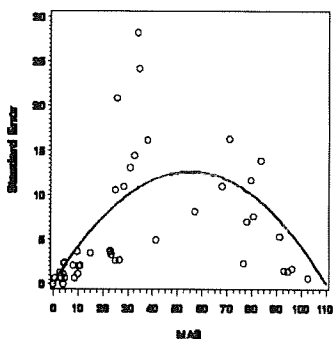


図 2 最小二乗法によりあてはめた MAS の SE の予測値

最小二乗法を用いた場合、

$$SE = -0.0042 \times (MAS^2 - 110 \times MAS)$$

という曲線があてはまった。あてはめた曲線の SE の予測値を表 1 に示す。

表 1 最小二乗法によりあてはめた MAS の SE の予測値

MAS	SE
5 or 105	2.2
10 or 100	4.2
20 or 90	7.5
30 or 80	10.0
55	12.6

表 1 より MAS の値によっては SE はかなり大き

な値である。MASが30から80の間ではSEが10以上になる。MASの値として±1SEで考えることにした場合でも、かなり大きなばらつきがあることを考えることになる。

ところで、図2からは極端に大きなSEを取った物質にあてはめ結果が影響しているようにもみえる。このため、SEの大きさはやや過大評価しすぎているかもしれない。そこで、はずれ値の影響を受けにくい推定法であるM推定量を用いて、2次曲線を推定することを試みた。この結果を図3に示す。

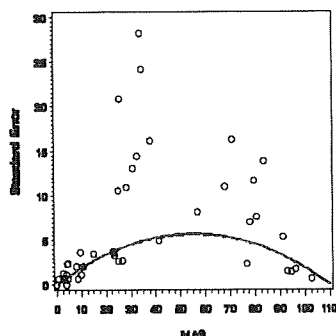


図3 M推定量によりあてはめたMASのSEの予測値

M推定量を用いた場合、

$$SE = -0.0019 \times (MAS^2 - 110 \times MAS)$$

という曲線があてはまった。あてはめた曲線のSEの予測値を表2に示す。

表2 M推定量によりあてはめたMASのSEの予測値

MAS	SE
5 or 105	1.0
10 or 100	1.9
20 or 90	3.4
30 or 80	4.5
55	5.7

図2と図3を比べると、MASの値が小さいところでは図3の方があてはまりがよいと思われる。物質の刺激性の判定という観点からは、MASが小さい値での評価がより重要になるであろう。よってMASの精度としては、少なくとも表2程度の誤差的なばらつきが生じることを考慮して、物質のスコアの解釈をすることにすればよいと思われる。

#### D. 考察

本研究は一昨年度からの継続研究である。本研究での提案は、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、代替法のスコアを用いて、対象となる毒性試験のスコアそのものの値を予測するというものである。提案法の基本的な考え方は初年度に示し、昨年度と今年度で理論的な検討の発展を行った。本年度の理論的な検討が昨年度までの解析方法と異なるのは、予測値の精度の考え方である。昨年度は、予測値の信頼区間を示したが、すべてをベイズ統計学の枠組みで統一した場合、信頼区間という考え方はなじまない。むしろ予測したθの事後分布に言及すべきであろう。この点はデータ解析において、訂正が必要である。

昨年度までは具体的な計算方法を提示しなかったため、今年度はその点にも言及し、提案法は通常の統計解析ソフトウェアで十分に計算できることを示した。重みが事前情報をどの程度反映させるかというパラメータに相当する。提案法を用いる場合には、この重みを与えなくてはならない。

理論的な側面は、今年度の方が昨年度より発展しているが、具体的な予測結果に関する点推定については昨年度示したことと同じになる。結果は、いくつかの物質について、MASの予測値とMASの間で乖離があった。これについては、詳細な検討も必要でもあるが、そもそもMASがどの程度の精度をもったスコアなのかを明示することが必要



であると感じるようになった。そこで、本年度はこの点についての検討も行った。筆者は、国内の多くのバリデーション研究に携わってきたが、その中では、対象となる動物実験のスコアの精度についてはあまり言及されてこなかった。この一因には、バリデーション研究を行う段階で、精度まで評価できる動物実験のデータが考慮されていないことが考えられる。本研究は、論文として公表されているデータを用いてデータ解析を行っているが、MASの精度に関しては、データが公表された文献を見つけることができなかった。このため、過去に得られたデータの利用許可を得て計算した。

本研究では、代替法のスコアから動物実験のスコアを予測する方法の構築を進めてきた。代替法を用いて動物実験のスコアを予測を行う際、予測が適切に行えているかどうかの評価には対象となる動物実験のスコアがどの程度ばらつきも考慮する必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

Omori T. (2009). Prediction of the toxicity score by in vitro test: an application of Bayesian linear regression. *ALTEX* 26, Spec. Issue 181.

Omori T. (2009). Prediction of the toxicity score by in vitro test: an application of Bayesian linear regression. *AATEX* 14, Supplement 1060.

#### 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.

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.

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.

Press, S. J. *Bayesian statistics: principles, models, and applications*. John Wiley & Sons, Inc., 1989.

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（医薬品・医療機器等バイオテクノロジー総合研究事業）

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

## 分担研究報告書

### 「代替法についての国際情勢の調査」

研究分担者 板垣 宏 日本化粧品工業連合会  
研究協力者 岡本 裕子、荒島 雅樹、加藤 義直、金森 健之、川上 幸治、桑原 裕史、坂口 育代、坂口 斉、坂口 眞由美、實川 節子、瀬戸 洋一、中村 恒彰、萩野 滋延、矢作 彰一、加賀 光明

#### 研究要旨

本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進するためには、関連する国際情勢の調査は必要不可欠な研究活動である。特に EU では、2003 年 3 月に公布され 2009 年 3 月 11 日に発効した「化粧品指令第 7 次改正」と 2007 年 6 月 1 日に発効した「化学物質の登録と規制 (REACH)」のため、ECVAM を中心に動物実験代替法の開発と評価は非常に進展している。一方、米国においては ICCVAM が中心となって代替法の評価が進行している。近年、代替法の開発と評価はグローバル化が加速し、国際的な協力体制が整いつつあり、本邦における対応案策定にはこれら国際情勢の調査・把握は重要である。

本年度の特筆すべき動きは、ICATM が 2009 年 4 月 27 日に調印式を終え、正式に始動したことが挙げられる。2009 年 9 月 9 日～11 日に ICCR-3（第 3 回化粧品規制協力国際会議）が東京で開催され、国際貿易への障壁を最小化しつつ、世界的に最高レベルでの消費者保護を維持する目的で、化粧品関連の問題について議論された。

EU においては、ESAC が水溶性物質の眼腐食性と強刺激性並びに水溶性の界面活性剤の無刺激性を確認するための試験法として Cytosensor Microphysiometer を、水溶性物質の眼腐食性と強刺激性を確認する試験法として Fluorescein Leakage を承認したことが挙げられる。米国においては、感作性試験代替法について、従来の LLNA から動物数を削減した rLLNA 並びに非 RI-LLNA (LLNA:DA 及び LLNA:BrdU-ELISA) が制限付で感作性、非感作性物質の識別に利用可であると ICCVAM の第三者科学専門家委員会で結論づけたことが挙げられる。

日本においては、JaCVAM に設定された皮膚刺激性、皮膚感作性、眼刺激性、急性毒性を評価する第三者委員会の活動が本格稼働したことが挙げられる。この作業に対応する目的で、日本化粧品工業連合会内にタスクフォースが作られた。また、厚生労働科学研究班における「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会」活動が進展し、報告会が開催された。

このように国内外の代替法に関する情勢は急速に変化しており、関連情報を継続的に収集分析し、その結果を公表していくことは、本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進するうえで必要と考えられる。

#### A. 研究目的

本邦における動物実験代替法の開発と評価を推進するためには、関連する国際情勢の調査は必要不可欠な研究活動である。特に EU では、2003 年 3 月 11 日に公布され、2009 年 3 月 11 日に発効した「化粧品指令第 7 次改正」(2003/15/EC) と 2007 年 6 月 1 日に発効した「化学物質の登録と規制」(Registration

Evaluation and Authorization of Chemicals; REACH) のため、欧州代替法検証センター (European Centre for the Validation of Alternative Methods; ECVAM) を中心に動物実験代替法開発と評価は非常に進展している。

一方、米国においては代替法検証省庁間連絡委員会 (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative

Methods;ICCVAM) が中心となって代替法の評価が進行している。最近、代替法試験協力国際会議 (International Cooperation on Alternative Test Methods;ICATM) の設立に見られるように国際的なバリデーションや専門家による第三者評価の体制が整いつつあり、今後、代替法の開発と評価はグローバル化が加速するものと考えられ、本邦における対応案策定にはこれら国際情勢の調査・把握は重要である。

本研究においては、以前よりこれらの欧米の動向をより密接な情報収集活動により把握し、適切な対応を講じることで、動物実験代替法の開発と利用を促進することを目標に調査研究を推進してきた。

## B. 研究方法

### B-1 情報収集

情報収集は、過去の本研究による経験から、いくつかのホームページ(SCCS、OECD、ECVAM、ICCVAM、EPAA など) を定期的に検索すると共に EU については同地域の化粧品工業会である欧州化粧品工業会 (COLIPA)、米国については米国化粧品工業会 (Personal Care Products Council ; PCPC、旧称 CTFA : Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association) との連繋を通じて実施した。その他、代替法の承認状況等については、専門学会の会誌やニュースレターも参考とした。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験代替法に関する情報を収集することにより、実験動物の福祉向上を目指すものであり、ヒトや動物の権利や福祉に抵触するところはない。

## C. 研究結果及び考察

### C-1 EU における動物実験禁止と代替法開発の動向

#### C-1-1 化粧品指令第7次改正

化粧品指令第7次改正が2003年3月11日付けで公布され<sup>1)</sup>、公布から6年を経て、欧州域内での動物実験禁止が2009年3月に施行された。2009年12月に同化粧品指令が再編され、新化粧品規則 (1223/2009/EC) として告示された<sup>2)</sup>。また、反復投与毒性、生殖毒性、毒物動態以外の動物実験を実施した原料を配合した化粧品のEU域内での販売も禁止された。当該事項に関し、2009年3月31日、欧州議員から欧州委員会へ、皮膚感作性、UV 誘導毒性、光アレルギー、発がん性試験の動物実験禁止期限

(2009年か2013年か)に関する質問がなされ、欧州委員会が回答した<sup>3)</sup>。これによると、欧州委員会は「反復投与毒性」はさまざまな評価項目をカバーするとみなした。実際、欧州委員会が採択した段階的廃止スケジュールでは、皮膚感作性、亜急性及び亜慢性毒性、UV 誘導毒性、光アレルギー (感作) 及び発がん性についても2013年3月を禁止期限として挙げている。これらを「反復毒性」として分類した理由は、毒性が反復投与の結果として生じるという事実にあるとしている。

この化粧品指令第7次改正の基本的骨子は、以下の通りである<sup>1), 4), 5)</sup>。

#### ・化粧品及び化粧品原料の EU 域内の動物実験禁止

・化粧品：加盟国の国内法施行後に即時禁止

※猶予期間は最大18ヵ月 (2004年9月)

・原料：代替法がある場合は加盟国の国内法施行後に即時禁止、完全な動物実験禁止は化粧品指令発効の6年後 (2009年3月)。

・EU委員会は、Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) のバリデーションの進展を考慮した上で、SCCNFP及び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。

・動物実験を実施した製品又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域外での動物実験がなされた製品及び原料も含む)

・代替法がある場合は、加盟国の国内法施行後に即時禁止

※猶予期間は最大18ヵ月 (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

・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及び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。

#### C-1-2 ECVAMにおける代替法開発状況

化粧品指令第7次改正では種々の動物試験の段階的廃止に関する timetable 作成が要求されている。本件に関しては、2004年4月30日に、" Report for establishing the

timetable for phasing out animal testing for the purpose of the Cosmetic Directive”を ECVAM が報告している<sup>9)</sup>。この ECVAM の報告書では、皮膚腐食性、皮膚刺激性、光毒性、光遺伝毒性を除く多くの試験法は、化粧品指令第 7 次改正の禁止年には完全代替は困難と予測されている。

このため、ECVAM<sup>7)</sup>は、第 6 次 Framework Programme on Research and Development (FP6) として、① A-Cute-Tox Project (急性毒性試験)、② ReProTect Project (生殖発生毒性試験)、③ Sens-it-iv (感作性試験) を組織している。

A-Cute-Tox Project は実験動物を使用しない急性毒性試験の開発を目的に 2005 年 1 月 1 日に開始された 5 年間のプロジェクトである。35 名の共同研究者、総予算 1560 万ユーロ、そのうち EU から 900 万ユーロの予算を受けて、ヒトにおける急性毒性を予測する *in vitro* 試験の開発、戦略の最適化、プレバリデーション、データベースの作成等を実施している。現在 9 つの Work package で検討が進められている。2010 年 1 月から 5 月の期間で The best performing *in vitro* assays に対するプレバリデーションが行われる予定である。<sup>8)</sup>

ReProTect Project は *in vitro* 生殖発生毒性試験の開発と最適化の促進を目的に、35 の大学、行政機関、企業などの共同研究者、約 910 万ユーロの資金を受けて進められている。正式には 2004 年 7 月から 5 年間の予定で開始され、現在 3 つの大きな研究テーマ (受精、着床、生前発育) そしてそれら研究の横断的技術に関して研究が進められた。

Sens-it-iv プロジェクトは 30 名の共同研究者、1100 万ユーロの資金を受けて、2005 年 10 月から 5 年間の予定で開始された。プロジェクトの目的は、皮膚及び吸入における感作性物質を同定する *in vitro* 試験法による動物試験の代替である。現在このプロジェクトには 28 のグループ (9 つの企業、15 の大学や研究機関、4 つの業界団体) が参加しており、プロジェクト活動は 10 の Work package で進められている。2009 年 11 月の Newsletter 上で、バリデーション研究用 29 物質を最終決定した。<sup>9)</sup>

ECVAM は第 7 次 Framework Programme on Research and Development (FP7) として 2008 年 5 月より Predict-IV というプロジェクトを 5 年間の予定で開始した<sup>10), 11)</sup>。このプロジェクトは、動物によらない試験系、細胞生物学、

機能毒性学及び *in silico* を統合することによって、迅速かつ安価に薬物の安全性を評価する戦略を作ることを目標としている。

皮膚刺激性試験代替法に関しては、ECVAM 科学諮問委員会 (ECVAM Scientific Advisory Committee; ESAC) が、2008 年 11 月 5 日の第 29 回会議において、皮膚刺激性試験代替法として EpiDerm SIT と SkinEthic Reconstructed Human Epidermis (RhE) を承認した。これらの試験法は、無皮膚刺激性物質 (EU におけるノンラベル区分) と皮膚刺激性物質 (R38 の注意表示をする区分) を判別できる試験法であることから、化粧品原料の評価にも活用されることが考えられる。このように化粧品原料の皮膚刺激性を評価できると考えられる *in vitro* 法は、2007 年に ESAC で承認された EPISKIN と合わせて 3 種となり、試験法の選択肢が広まった。これら 3 種の試験法は、2009 年 9 月に公開されたドラフト OECD テストガイドライン (TG) に記載され、GHS 識別も含めて検討中である。<sup>12)</sup>

眼刺激性試験代替法に関しては、ECVAM において弱い眼刺激性を検出するために細胞を用いた方法 (Neutral Red Release; NRR, Red Blood Cell; RBC, Fluorescein Leakage; FL, Cytosensor Microphysiometer; CM) が再評価され、2009 年 7 月 7、8 日の第 31 回 ESAC 会議において、CM を水溶性物質 (及び混合物) の眼腐食性と強刺激性を確認する試験法として、また水溶性の界面活性剤及び水溶性の界面活性剤配合の混合物に対して無刺激性を確認するための試験法として承認した。さらに、FL を水溶性物質 (及び混合物) の眼腐食性と強刺激性を確認する試験法として承認した。<sup>13)</sup> また、3D 培養モデル (SkinEthic Human Corneal Epithelial Model, EpiOcular OCL-200 Model) のバリデーションが実施されている。

皮膚感作性試験代替法に関しては、2009 年 9 月に ECVAM より、Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)、human Cell Line Activation Test (h-CLAT)、Myeloid U937 Skin Sensitisation Test (MUSST) の 3 試験のプレバリデーションを開始するにあたり、参加施設募集の案内があった。<sup>14)</sup>

ECVAM は ESAC の再編と専門家集団 (EcvamExpertPool:EEP) 設置を告知し、また新たに、ECVAM の活動に対する意見を求めるための ECVAM Stakeholder Forum (ESTAF) を設置することを発表した。<sup>15)</sup>