

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

初年度に、ヒト細胞株 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である h-CLAT の改良を行った。まず従来の平均値による予測モデルを、生物反応をより適切に捉えられると考えられる個別評価に改良し、偽陰性が減少することを見出した。次に陽性対照物質である DNCB の適用推奨濃度を、過去の試験結果に基づき 5.0µg/mL から 4.0µg/mL に変更し、高い安定性を確認した。さらに、予測モデルの変更に伴い、CD86/CD54 発現亢進最小濃度 (EC150, 200) の算出方法も、平均値から中央値へ変更し、同時に外挿法も加えることで効率と精度の両立を可能とする算出スキームを作成した。以上の改良により、h-CLAT 法の有用性が向上した。

次年度には、ヒト細胞株 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である h-CLAT の化粧品原料における有用性と適用限界を明らかにすべく検討を行った。防腐剤、染毛剤および香料 30 品の検討により、自家蛍光を有する物質や揮発性物質を含む化粧品原料評価における h-CLAT の有用性が示された。一方、適切に評価できなかった原料に関する考察より、感作性ポテンシャルが非常に弱い物質や難溶性物質に関する課題も明らかとなった。また、構造が類似している感作性物質の h-CLAT 結果の考察より、こうした in vitro のモデル評価系が in vivo における感作性ポテンシャルの予測に有用である可能性が示された。

最終年度には、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。さらに化粧品原料に関する本試験法の有用性についても確認することができた。今後今回の研究により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 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 2nd 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 3rd 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 4th Japanese inter-laboratory Study", *AATEX*, **13** (2), 70-82, 2008.

F. 研究発表

- 1) 大野泰雄：動物福祉と動物実験代替法への考慮の必要性について、*Biophilia* **3**, 4-5 (2007)
- 2) 大野泰雄：日本薬理学会の奨める動物実験－苦痛の評価と軽減－「はじめに」および日本薬理薬器あのみ動物実験指針、*日薬理誌*, **129**, 5-9 (2007)
- 3) 大野泰雄：動物実験代替法の国際動向、*Fragrance Journal* **10**, 20-28 (2007)
- 4) 大野泰雄：薬学研究における動物実験代替法研究の重要性とその問題点。薬学雑誌, **128** (5) 735-740 (2007)
- 5) 大野泰雄：WC6（第6回国際動物実験代替法会議）を終えて。日本動物実験代替法学会 News Letter. **34**, 2-4. (2007)
- 6) 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.
- 7) Kojima, H., Ando, T., Inagaki, K., Ohhira, M., Kosaka, T., Nakamura, Y., Torishima, H., Morikawa, N., Kanno, J., Kuboki, M., Genno, M., Nokata, M., Harada, T., Morimoto, T. Yoshimura, I., Ohno, Y. : Validation of human skin

models for skin corrosivity tests in Japan, *Altern. Animal Test. Experiment*, **13**, 36-44 (2008)

- 8) 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 2nd Japanese Inter-laboratory Study", *AATEX*, **13** (2), 55-62, 2008.
- 9) 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 3rd Japanese inter-laboratory study", *AATEX*, **13** (2), 63-69, 2008.
- 10) 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 4th Japanese inter-laboratory Study", *AATEX*, **13** (2), 70-82, 2008.
- 11) 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 skin sensitization potential using h-CLAT", in submitting.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 大野泰雄：日本薬理学会の動物実験指針と動物実験の第三者評価について、日本薬理学会編、実践行動薬理学 p337-347, (2010. 3. 1)
- 15) 大野泰雄：非臨床試験をめぐる新たな流れ-JaCVAMの活動を中心に-“医薬品GLPガイドブック2009” p6-31, (財)日本薬剤師研修センター編集、薬事日報社 (2009. 9. 14)
- F-2. 学会発表
- 1) 大野泰雄：第6回国際動物実験代替法会議開催報告. 日本動物実験代替法学会総会 (2007. 11. 20) 東京
- 2) 金子晃久、加藤基浩、橋本博幸、山田泰弘、長谷川真絹、中村明生、神山佳輝、森田繁道、大野泰雄：中空糸3次元培養ヒト凍結肝細胞を用いた CYP3A 酵素誘導評価と施設間バリデーション. 日本薬学会第128年会 (2008. 3. 28)
- 3) 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., "Results of a Japanese Ring Study of a Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting Skin Sensitization Potencial (1st report): Inter-laboratory Reproducibility", Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.
- 4) Okamoto K., Kosaka N., Kuwahara H., Mizuno M., Okamoto Y., Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Yoshida M., Ohta N., Kodama T., Sato J., Sakaguchi H., Ashikaga T. and Ohno Y., "Results of a Japanese Ring Study of a Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting Skin Sensitization Potencial (2nd report): A study of the Criteria for THP-1 Cell Serection", Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.
- 5) Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Kosaka N., Okamoto K., Mizuno M., Yoshida M., Kodama T., Sato J., Ota N., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H., Ashikaga T. and Ohno Yasuo., "Results of a Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (3rd Report): Effect of Serum Difference", Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.
- 6) Mizuno M., Yoshida M., Kodama T., Sato J., Ota N., Okamoto Y., Kosaka N., Okamoto K., Kuwahara H., Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Sakaguchi H., Ashikaga T. and Ohno Y., "Results of a Japanese Ring Study of a Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Predicting Skin sensitization Potential (4th report): Effects of pre-culture conditions", Abstracts of 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 72, 2007.
- 7) Wakuri, S., Kitagaki, M., Itagaki, H., Ohno, Y., and Tanaka, N., "Application

- of cytotoxicity assays as alternatives to acute oral systemic toxicity tests", 6th world congress on alternatives & animal use in the life sciences, 2007.
- 8) 金澤由基子、横関博雄、中田土起丈、坂口斉、大野泰雄、小島 肇：医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関わるあり方検討委員会報告 感作性試験分科会からの報告、日本動物実験代替法学会第21回大会、埼玉（2008）
- 9) 小坂七重、稲葉宏幸、岡本賢二、水野誠、蘭さき子、加藤義直、岸正孝、足利太可雄、岡本裕子、桑原裕史、中村恒彰、坂口斉、大野泰雄：In vitro 皮膚感作性試験：h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の日本における共同研究（第5報）－防腐剤の評価におけるh-CLATの有用性検討－、日本動物実験代替法学会 21回大会、ポスター番号33、2008.
- 10) 岡本賢二、加藤義直、岸正孝、桑原裕史、蘭さき子、小坂七重、水野誠、稲葉宏幸、中村恒彰、岡本裕子、坂口斉、足利太可雄、大野泰雄：In vitro 皮膚感作性試験：h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の日本における共同研究（第6報）－染毛剤の評価におけるh-CLAT の有用性検討－、日本動物実験代替法学会 21回大会、ポスター番号34、2008.
- 11) 蘭さき子、水野誠、小坂七重、岡本賢二、加藤義直、稲葉宏幸、中村恒彰、岸正孝、桑原裕史、坂口斉、岡本裕子、足利太可雄、大野泰雄：In vitro 皮膚感作性試験：h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の日本における共同研究（第7報）－香料成分の評価における h-CLAT の有用性検討－、日本動物実験代替法学会 21 回大会、ポスター番号 35、2008.
- 12) Kojima, H., Iijima, M., Matsunaga, K., Sasa, H., Itagaki, H., Okamoto, Y., Nishiyama, N., Mita I., Washida, J., Masuyama, K., Onodera, H., Masuda, M., Ohno, Y.: Review of an alternative to animal testing for safety evaluation of cosmetic ingredients using Quasi-drug, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)
- 13) Inoue, T., Masuda, M., Akita, M., Kojima, H. and Ohno, Y.: JaCVAM statement on new alternative to animal testing, 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome (2009)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究年度終了報告書

バリデーショングデータの統計解析

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、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。本研究は、代替法のスコアを用いた毒性試験のスコアの予測を行う統計的なアプローチを構築することを目的とした。

[方法] バリデーション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。

[結果] ベイズ統計の枠組みを用いて、統計的較正法で毒性試験を予測する理論的方法論を構築した。また、この方法を国内で行われた眼眼刺激性試験代替法の細胞毒性試験のバリデーション研究のデータに適用した。また、結果の解釈を行う上で、毒性試験のスコアの精度を考慮することが必要となるため、ドレイズ眼刺激性試験のスコアであるMASの標準誤差をモデルを用いて推定した。

[結論] バリデーション研究で、代替法と毒性試験の間で直線関係が想定できるような関係が見出せれば、その関係を利用し、定量的に毒性試験のスコアを予測することができる。その解釈には、代替法、毒性試験双方のスコアのばらつきを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ン研究が行われている。バリデーション研究では、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値化により、得られる情報の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。そこ

で、本研究では、バリデーション研究によって明確に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関係を利用し、代替法のスコアで動物実験のスコアの予測を行うことを考える。2値化を行うことなく、代替法で得られる結果から、対象となる動物実験のスコアが予測できれば、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。

本研究では、動物実験のスコアの予測方法として、回帰分析を利用した統計的較正法を用いた方法を提案する。統計的較正法は、較正段階と予測段階の2段階からなる方法で、古くから広く知ら

れている。詳細は研究方法で示すが、本研究で考えている状況では、較正に利用できるデータは極めて少ない。さらに、利用する代替法は、バリデーション研究が行われているということをも想定している。このため、較正には、バリデーション研究で得られた事前情報を積極的に用いることにする。そこで、広く知られている統計的較正法ではなく、ベイズ統計学の枠組みで較正を行うことを提案する。研究を進める中で、予測段階では、較正段階で推定したパラメータを使って推測を行うことで可能であるが、較正段階と同様にベイズ統計学の枠組みで考えた場合、ある種の条件では、予測値の事後分布は、通常の統計的較正方法と極めて類似した公式で計算できることがわかった。このため、研究結果として、方法論の導出も示すことにする。また、提案する方法を実際にデータに適用した結果、用いたデータの毒性試験のスコアの精度についても研究結果に示す。最後に、提案方法の考察と結論を示すことにする。

B. 研究方法

B.1 本研究が想定している具体的な例

B.1.1 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 IC50 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している。

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

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

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_{1i} は対数変換を施した IC50 である。 ε_{1i} は互いに独立で同時に $N(0, \sigma^2)$ に従う誤差であり、 α 、 β 、 σ^2 は未知のパラメータである。つまり、較正段階では、 α 、 β 、 σ^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 IC50 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 θ 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 θ を予測する。ここで、 $\hat{\alpha}$ と $\hat{\beta}$ は α と β 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 γ と δ 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、 θ 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。本研究で想定している実験の特徴は、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 α と β をここでは α_* と β_* 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(繁柁(1985), Bromeling(1985), Press(1989))。そこで、(2)式の $\hat{\alpha}$ と $\hat{\beta}$ の代わりに α_* と β_* を用いて θ を推定すれば、実用上は予測値を推定できることになる。

本研究を進める上で、このような推定量が、ベイズ統計学の枠組みで説明できることがわかった。そこで、その詳細は研究結果に示すことにする。

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。その方法を研究結果に示す。

B.5 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 IC50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ず不明であった。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。SIRC-CVSでは、1次から3次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。

B.6 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として、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直線的な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

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

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

β と σ^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 , λ_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

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

となる。ただし、

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

$$\beta_* = (C_0 + X'X)^{-1}(C_0\beta_0 + X'y_1)$$

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 θ とする。 θ を与えたときの y_2 の予測分布は、

$$p(y_2|\theta, y_1, \mathbf{X}) \propto \iint p(y_2|\theta, \boldsymbol{\beta}, \sigma^2) p(\boldsymbol{\beta}, \sigma^2|y_1, \mathbf{X}) d\boldsymbol{\beta} d\sigma^2 \propto \left[\lambda_* + \frac{(y_2 - (\alpha_* + \beta_*\theta))^2}{1 + (1 - \theta)(\mathbf{C}_0 + \mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}(1 - \theta)'} \right]^{-\frac{v+1}{2}}$$

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

$$\lambda_* \left[1 + (1 - \theta)(\mathbf{C}_0 + \mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}(1 - \theta)' \right]$$

の t 分布に従う。

予測段階として、 θ を予測するためにこの事後分布 $p(\theta|y_1, y_2, \mathbf{X}_1)$ を考えることにする。ベイズの定理より

$$p(\theta|y_1, y_2, \mathbf{X}) \propto p(y_2|y_1, \theta, \mathbf{X}) p(\theta|y_1, \mathbf{X}) = p(y_2|y_1, \theta, \mathbf{X}) p(\theta) \quad (4)$$

である。較正段階の回帰係数とは異なり、 θ 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、 θ の事後分布について推測を行うことは、尤度にもとづき θ 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、

$$y_2 - (\alpha_* + \beta_*\theta) = 0 \quad (5)$$

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、提案法における点推定は、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。

(4)式から導かれる提案法の推定値は、事後分布が最大となる値として示される。推定の精度は、(4)式の事後分布を描くことで示することができる。

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 θ は事後平均 $\boldsymbol{\beta}_* = (\alpha_*, \beta_*)'$ を $(\mathbf{C}_0 + \mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}(\mathbf{C}_0\boldsymbol{\beta}_0 + \mathbf{X}'\mathbf{X}\boldsymbol{\beta})$ から求め、実験から得た y_2 を用いて、

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

として求めればよい。それぞれがわかっているならば、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

$\mathbf{y}_0 = (y_{01}, y_{02}, \dots, y_{0n_0})'$ とし、定数とこの研究で得ら

れた動物実験のスコアからなる計画行列を

$$\mathbf{X}_0 = \begin{pmatrix} 1 & x_{01} \\ 1 & x_{02} \\ \vdots & \vdots \\ 1 & x_{0n_0} \end{pmatrix}$$

とする。そして、個々の測定値にかかる適当な重みを

$$\mathbf{W}_0 = \begin{pmatrix} w_{01} & 0 & \dots & 0 \\ 0 & w_{02} & & 0 \\ \vdots & & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & w_{0n_0} \end{pmatrix}$$

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 \mathbf{y}_1 と \mathbf{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

$$\begin{aligned} & (X_*' W_* X_*)^{-1} (X_*' W_* y_*) \\ & = (X_0' W_0 X_0 + X' X)^{-1} (X_0' W_0 X_0 \beta_0 + X' X \hat{\beta}) \end{aligned}$$

となる。ここで $C_0 = X_0' W_0 X_0$ 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 提案法の適用

わが国で実施されたドレイズ眼刺激性試験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 次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 (IC50) の散布図を示す。

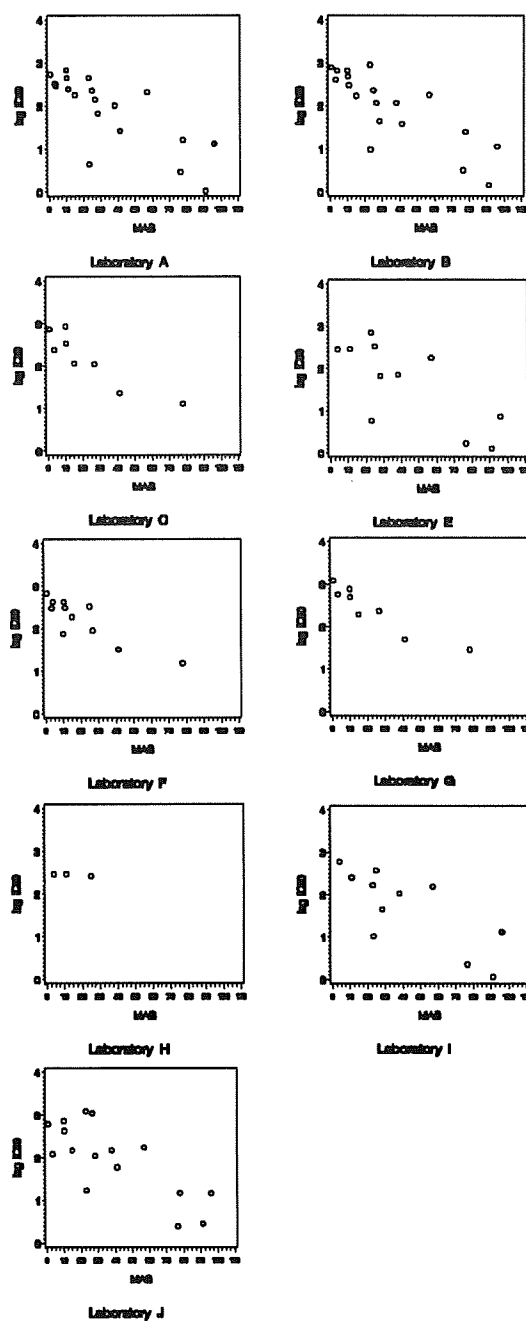


図 1 MAS と log (IC50) の散布図

以下では、施設 B 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。

表 1 に提案法を適用した結果を示す。

表 1 提案法による予測結果

施設 B の IC50 を値で予測。3 種類の重みを用いた提案法の予測値とバリデーション研究で得られた MAS の値。19 物質中、陽性対照物質 3 物質を除いた 16 物質の予測の結果。

Chemical	log IC50	Predicted values			Reported MAS
		$n_0 = 0$	$n_0 = 3$	$n_0 = 19$	
S1-4	2.61	7.3	4.9	4.2	3.3
S2-5	2.82	0.6	0	0	4
S1-8	2.82	0.6	0	0	10
S1-5	2.69	4.7	1.5	0.5	10.3
S2-1	2.48	11.3	10.2	9.8	11
S3-5	2.95	0	0	0	23
S3-2	0.99	58.5	73	76.9	23.3
S2-3	2.36	15	15.2	15.2	25
S1-6	2.07	24.3	27.5	28.3	26.7
S3-10	1.65	37.6	45.2	47.2	28.3
S3-6	2.07	24.4	27.7	28.5	38
S3-14	2.26	18.3	19.6	19.9	57
S3-7	0.51	73.9	93.5	98.7	76.7
S1-10	1.40	45.5	55.8	58.5	78
S3-4	0.17	84.6	107.7	110	91.3
S3-11	1.06	56.4	70.3	74	96.3

提案法では、較正段階で回帰分析を利用することになるが、この回帰係数の事後平均は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、3 種類の重みを適用した。1 つ目は、事前情報を全く使わないというもので、つまりこれは、古典的な推定量と同じである。2 つ目は、陽性対照物質と同じ物質数の 3 としたもの、3 つ目は、利用できる物質 19 物質分とした。

図 2、図 3 は、2 つの物質について、それぞれ事前情報の重みを 3 としたときの θ の尤度である。(4) 式からはこれが事後分布として解釈できるため、単に予測の点推定値を示すだけでなく、このような図を描くことによって、結果の評価を行うことが望ましいであろう。

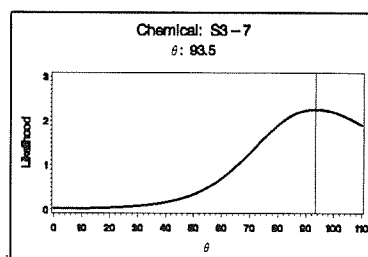


図 2 物質 S3-7 の θ の対数尤度 ($n_0=3$)

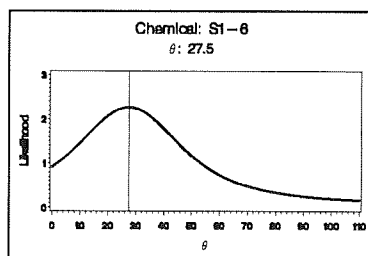


図 3 物質 S1-6 の θ の対数尤度 ($n_0=3$)

C.4 動物実験のスコアの精度

図 4 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。

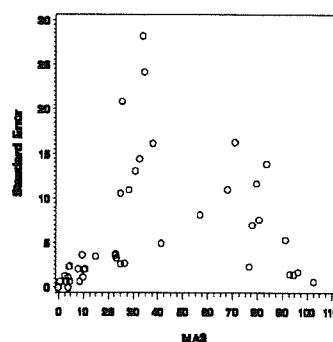


図 4 MAS の SE と MAS

図 5 は図 4 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。表 2 にいくつかの MAS の値の標準誤差の予測値を示す。

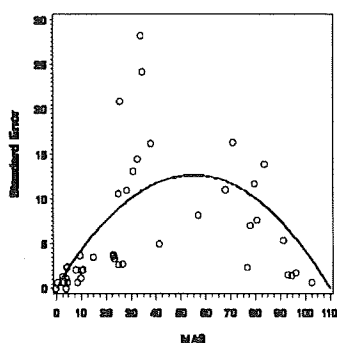


図 5 最小二乗法によりあてはめた MAS の SE の予測値

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

表 2 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 2 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 $\pm 1SE$ 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 5 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 6 に示す。表 3 に、いくつかの MAS の値について、M 推定量で求めた標準誤差を示す。

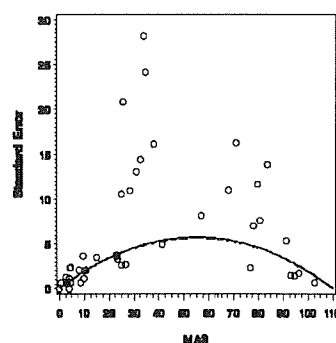


図 6 M 推定量によりあてはめた MAS の SE の予測値

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

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 3 に示す。

表 3 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 5 と図 6 を比べると、MAS の値が小さいところでは図 6 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 3 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

Ohno (2004) 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の提案している。

本研究ではそれを拡張し、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ことを提案し、具体的な方法論の構築を行った。

データ解析に基づいて、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 から SIRC-CVS の log IC50 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、いくつかの物質は明らかに直線的な関係から外れている。データ解析で示した MAS の実測値はそのような値も含んでいるので、そもそも直線関係からはずれている物質については、提案法の値と MAS の実測値の間で乖離が生じてしまう。したがって、バリデーション研究などで、どこまで代替法と対象となる毒性試験の直線性が認められるかということの評価が提案法を利用する上で重要となるであろう。結果の解釈には単に点推定を行うだけでなく、図 2 や図 3 で示したような予測の精度と、図 5 や図 6 で示すような対象となる動物実験のスコアの精度を加味して毒性の評価を行うことが必要になるであろう。この評価は簡単ではないかもしれないが、2 値化という判定とは異なり、定量的に毒性の評価を行える。また、毒性試験のスコアの尺度で予測ができるので、動物代替法という観点からもそのような評価方法が望ましいと思われる。

本研究を要約すると以下のとおりである。バリデーション研究で、代替法と毒性試験の間で直線関係が想定できるような関係が見出せれば、その関係を利用し、定量的に毒性試験のスコアを予測することができる。その解釈には、代替法、毒性試験双方のスコアのばらつきを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.

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 耕 算 男. *ベイズ統計入門*. 東京大学出版会, 1985.

分担研究年度終了報告書

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) との連繫を通じて実施した。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¹⁾、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

²⁾。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³⁾。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、重急性及び重慢性毒性、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^{1), 4), 5)}。

- ・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⁶⁾。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、ECVAM⁷⁾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。⁸⁾

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。⁹⁾

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^{10), 11)}。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と考えられる。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)に収載され、GHS 識別も含めて検討中である。¹²⁾

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。¹³⁾ 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。¹⁴⁾

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。¹⁵⁾

C-1-3 SCCS の状況

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) は欧州委員会のもとにある化粧品 of 安全性に係わる科学委員会であり、その前身は Scientific Committee on Consumer Products (SCCP) であり、また、Scientific Committee on Cosmetic products and Non-Food Products intended for consumers (SCCNFP) である。2008 年 7 月 2 日付けで欧州委員会は「化粧品業界における動物試験代替法の開発、バリデーション及び法的な受け入れに関するレポート (2007)」を発行した。この中で、代替法の開発状況については皮膚刺激性の Episkin を除き 2005 年と大差なしと述べている。また、EU 域内で実施された動物実験に言及し、毒性試験の割合は 8% で、そのうち、化粧品に関したものは 0.5% と報告している¹⁶⁾。

2009 年 1 月の第 19 回 SCCP 総会で「化粧品原料の動物実験を用いない遺伝毒性/変異原性試験に関する状況報告」が採択された。これによると、*in vitro* 試験は非常に感度が高く *in vitro* 試験の組合せで陰性の場合変異原性は陰性と判定できる。しかしながら、陽性を示した場合は動物実験をせずに陽性判定を覆すことができる代替法が存在しないため、動物試験を実施できない場合に化粧品原料の毒性評価の一部を果たすことができなくなるとしている。なお、欧州科学委員会 (SCHER/SCCP/SCENIHR) は、2009 年 1 月に「遺伝毒性とがん原性物質のためのリスク評価の方法論とアプローチ」についてオピニオンを公表し、がん原性リスクの定量的評価は *in vitro* と *in vivo* の遺伝毒性試験の結果だけを基に行うことはできないため、動物を用いた適切な試験が必要であると述べている。

SCCS は 2009 年 12 月 8 日付の「EU 域内における化粧品原料のヒト健康に関する安全性評価における代替法」に関する意見書を公開した。この意見書によると代替法の承認状況は昨年度の本報告書に記載した内容と大差はなかった。しかし、変異原性遺伝毒性では、細胞を用いる復帰突然変異試験

(TG 471)、哺乳類の培養細胞を用いる *in vitro* 遺伝子突然変異試験 (TG 476) 及び *in vitro* 小核試験 (TG 487) の 3 点セットが要求されることを示した。もし、これらの試験で陽性の結果が得られた場合は、動物を用いる試験で陰性であることを証明する必要があるため化粧品指令を遵守すると開発は不可能となることが示された。また *in vitro* 小核試験 (TG 487) は哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験 (TG 473) でも可であることも記述されている。

C-1-4 EU 委員会の状況

2005 年 11 月 7 日に行われた欧州委員会主催のワークショップ「EU goes Alternatives」において 3Rs 宣言が発表され、今後、EU の各産業分野において、効果と安全性の両面に関する代替法の開発を促進することが宣言された。EPAA (European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing) は欧州委員会、工業会 (化学品、医薬品、化粧品)、様々な産業分野における会社の共同のパートナーシップである¹⁷⁾。欧州委員会からは企業 (DG Enterprise)、研究 (DG Research)、健康と消費者保護 (DG Health and Consumer Protection)、環境 (DG Environment)、共同研究センター (DG Joint Research Centre) の常任理事会及び ECVAM の 6 団体が参加している。工業会は CEFIC (欧州化学品工業会)、EFPIA (欧州製薬団体連合会)、COLIPA、Euro BIO (欧州バイオテクノロジー工業会)、AISE (石鹼洗剤協会)、ECPA (欧州農業工業会) など 7 団体が参加している。企業からは医薬品、化粧品、化学品メーカーなど 37 社が参加している。その目的は、動物を用いる安全性試験の代替のアプローチとしての新しい 3Rs (refine, reduce, replace) の推進である。

パートナーシップの構造は以下の通りである。

- ・年次大会：ヨーロッパとグローバルにおける進歩を再検討する、年に一度の“3R”イベント。
- ・パートナーシップ運営委員会：欧州委員会、関連業界、企業からなり、レビューワークプラン、戦略、タイムラインを提案する。
- ・ワーキンググループ：欧州委員会、企業、適切な専門家のサポートで個々のテーマを扱う小ワーキンググループ。

- ・ステークホルダーのミラーグループ：学界、動物福祉団体、患者団体、消費者保護グループ、他のステークホルダーからなり、より広い見地で運営委員会にアドバイスする。

2006年5月に公表されたアクションプログラムは以下の5つのメインテーマからなっている。

- ・その後のアクションの計画と優先順位の情報を提供するための現在と過去の3Rsのマッピング
- ・3Rsのアプリケーションに基づく、今後の研究の優先順位付け、促進及び遂行
- ・3Rsの使用におけるベストプラクティスの同定、普及、遂行
- ・規制と政策決定における、3Rsの実現
- ・3Rsに基づくバリデーションと承認

2009年11月6日にBrusselsで第5回の年次大会(Annual Conference 2009)が開催された。内容としては「Dissemination of 3Rs Information」を主題としており、2009年のEPPA活動状況ならびに3Rsが実際、研究者の間でどの程度正しく理解され実施されているか、特に若手研究者への教育や3Rsを普及させていく上での問題点や障害等についての報告がなされた。また、企業・大学・EU委員会・代替法評価機関従事者で構成されるパネルディスカッションを設け、3Rsについて様々な観点(研究・教育・代替法開発・規制の観点)で今後の展望について議論がなされた。

REACH⁽⁸⁾⁻⁽²¹⁾については、EU域内で年間1トン以上製造・輸入されるすべての化学物質の登録を既存物質と新規物質を区別せずに義務付けるものであり、2007年6月1日に施行され、2008年6月1日に新官庁である欧州化学物質庁(European Chemicals Agency; ECHA)が発足した。それと同時に年間1トン以上製造/輸入されている既存化学物質の予備登録が開始され、2008年12月1日に締め切られた。約6万5千社から約260万件の予備登録がなされた。既存物質の登録期限は物質の製造・輸入量や有害性への懸念によって分けられ、2018年までに以下に示すように段階的に設けられている。

- ・年間1000トン以上の製造/輸入量のあるもの等：2010年11月30日
- ・年間100～1000トンの製造/輸入量のあるもの：2013年5月31日
- ・年間1～100トンの製造/輸入量のあるもの

の：2018年6月1日

年間1トン以上の物質の登録には、製造・輸入量に応じて物理化学的性状、ヒトの健康への有害性、生態毒性の情報が必要となる。動物試験が行われる場合、重複を避けるために関係書類の審査が義務づけられる。ヒトに対する毒性に関する情報は、可能なら代替手段によって脊椎動物以外の方法を用いて入手する。これらの代替手段はEU委員会によって確認され、さらに欧州化学物質庁又は国際的な機関によって認定されなくてはならない。EU委員会は代替法の使用に関し3年毎に報告書を提出し、必要なら新たな法的提案を行うことになっている。

以下に製造・輸入量ごとに実施すべき毒性試験に関して記載する。

- ・ *in vitro*皮膚刺激性又は皮膚腐食性：>1 t/年
- ・ *in vivo*皮膚刺激性試験：>10 t/年
- ・ *in vitro*眼刺激性：>1 t/年
- ・ *in vivo*眼刺激性試験：>10 t/年
- ・ 皮膚感作性：>1 t/年
- ・ 変異原性：>1 t/年
- ・ バクテリアを用いる *in vitro* 試験：>1 t/年
- ・ 哺乳類細胞を用いる *in vitro* 細胞遺伝学試験又は *in vitro* 小核試験：>10 t/年
- ・ 哺乳類細胞を用いる *in vitro* 遺伝子突然変異試験：>10 t/年 (ただし、バクテリアを用いる *in vitro* 試験と哺乳類細胞を用いる *in vitro* 細胞遺伝学試験又は *in vitro* 小核試験が陰性の場合)
- ・ 急性毒性：>1 t/年
- ・ 経口経路：>1 t/年
- ・ 吸入又は皮膚経路：>10 t/年
- ・ 反復投与毒性：>10 t/年
- ・ 短期反復投与毒性試験(28日間)：>10 t/年
- ・ 亜慢性毒性(90日)：>100 t/年 (>10 t/年の場合も有り)
- ・ 慢性毒性(>12ヵ月)や追加評価：>1000 t/年 (必要な場合有り)
- ・ 生殖毒性：>10 t/年
- ・ 生殖/発生毒性に関するスクリーニング：>10 t/年
- ・ 出生前発生毒性試験：>100 t/年
- ・ 二世代生殖毒性試験：>100 t/年
- ・ トキシコキネティクス：>10 t/年
- ・ アセスメント：>10 t/年
- ・ 発がん性試験：>1000 t/年

2009年8月のWC7において、EU委員会及びCOLIPAにより、反復全身毒性の代替法研究に関する共同出資プロジェクトが発表された。既に2009年7月30日にはEU委員会より2500万ユーロの研究プロジェクトの公募が開始されており、世界中から専門家が集まるWC7にてCOLIPAからも同額の出資を行なう旨の表明がなされた。これにより、総額5000万ユーロが反復全身毒性の代替法開発に費やされることになる。公募の締め切りは、2010年2月3日であり、2010年春にはプロジェクト内容が公表される予定である。

C-1-5 EU危険物質指令の状況

欧州化学薬品局 (European Chemicals Bureau; ECB) が更新しているEU危険物質指令の「物理化学的性質、毒性、環境毒性の測定法」のリストであるAnnex Vにおいて、2009年に新たな代替法の掲載はなかった。²²⁾

C-1-6 COLIPAの状況

COLIPAは動物試験代替法の開発と受け入れに向けたコーディネートを目的に、1992年にCOLIPAの動物試験の代替法に関する運営委員会 (Steering Committee on Alternatives to Animal testing; SCAAT) を常設の委員会として設置した。COLIPAは2009年に組織改革を行い、SPT (Strategic Project Team) の下にAAT (Alternatives to Animal Testing) が設けられ、現在、以下の5つのTask Force (TF) がある²³⁾⁻²⁶⁾。

- ① SPT AAT TF Eye Irritation (眼刺激性試験代替法の検討)
- ② SPT AAT TF Skin Tolerance (感作性・皮膚刺激性試験代替法の検討)
- ③ SPT AAT TF Genotoxicity (変異原性・遺伝毒性の検討)
- ④ SPT AAT TF Systemic Toxicity (全身毒性試験代替法の検討)
- ⑤ SPT AAT TF Safety Assessment (化粧品原料のリスクアセスメントのストラテジーを作成)

このうちSPT AAT TF Skin Toleranceにおいて、日本企業により開発されたヒト単球由来細胞株であるTHP-1細胞を用いた*in vitro*皮膚感作性試験h-CLAT²⁷⁾のring studyが2004年6月から開始され、2008年9月に終了した。この試験法以外にも、DPRA、MUSSTのring studyなども実施された。

先にも述べたように、COLIPAはEU委員会

がFP7の中で行われる反復全身毒性の代替法研究に協力し、その予算額の半分の2500万ユーロを分担することを決定した。

また、2009年3月11日の化粧品指令第7次改正の施行を踏まえ、動物実験代替法による化粧品原料及び化粧品のハザード評価及び安全性評価のための指針を、皮膚腐食性・皮膚刺激性、眼腐食性・眼刺激性についてそれぞれRegulatory Toxicology and Pharmacology誌に発表した^{29)、30)}。

C-1-7 その他の状況

EUにおけるその他の状況を、公的機関等の組織的活動と学会等に分けて以下にその概要を記載する。

①公的機関等の組織的活動の状況

・ZEBET

Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments (ZEBET)³¹⁾は、代替法の文書化、評価、推奨あるいは国内外での承認を推進することを目的に1989年にドイツの連邦リスク評価研究所に設立された組織である。業務の範囲は、代替法に係わる文書化と情報提供、バリデーション及び研究である。ZEBET業務の一つとして動物実験代替法のデータベースがあり、2000年2月からウェブにより無料で公開している。

・NC3Rs

National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs)³²⁾は動物試験、研究における3Rの推進、開発、実施を目的に2004年5月にイギリスに設立された。質の高い3Rs研究に資金を提供し、3Rsを広めるためのセミナーやシンポジウムを組織し、また、3Rsの情報源やガイドラインを開発している。独立した組織であり、英国内務省、Medical Research Council (MRC)、Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC)、The Association of the British Pharmaceutical Industry (ABPI)、The Wellcome Trust及び製薬・化学企業などより資金が提供されている。

・FRAME

Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments (FRAME)³³⁾は医学における動物実験に関して3Rを促進するために、1969年に設立されたイギリスの機関である。国際的科学雑誌ATLA (Alternatives To