

と思われる。

#### 4) 吸光度の測定波長

溶血はヘモグロビン変性の影響を受けにくい525nmで検出する方がばらつきが少ないことから、SOPでも波長を525nmに変更すべきである。

#### 5) 判定方法の改善

酵母-赤血球試験での総合判定には、2回の実験の再現性吟味に加えて、複数濃度の試験による用量反応関係を利用する方が良いと思われる。特に非照射下での結果に用量反応関係がある物質の場合は慎重な判定を行うべきである。この場合、3T3-NR法でも利用されているように、光照射と非照射で明らかに差のある用量反応関係が得られた場合は光毒性ありと判断しても差し支えないと考えるが、用量作用関係をきちんととれなかった時には、再試験を行うべきとした方が良いとの意見があった。

#### 6) 3T3-NRU法との比較

in vivoとの対応性については、3T3-NRU法より優れているとの証拠は無いが、擬陽性も陽性と判断すると、感度はほぼ同等と考えられる。

#### 7) GLP 遵守

かなり大幅なデータクリーニングが必要であった。GLP遵守を徹底すべきである。または、データの信頼性確保のためのシステムを作っておくべきである。

#### 8) その他

①6-MethylcoumarinとBithionolはモルモットでは陰性であったが、他の動物種において陽性反応が確認されていることから、光毒性陽性物質として判断して良い。chlorhexidineについては光毒性は弱いと陽性との報告もある。

④Rose Bengalの様に見視光で活性化されるものはランプによる影響を受けやすい可能性がある。

⑤太陽光シミュレータでは培養液の温度上昇による影響に留意する必要がある。

⑥試験結果はランプや検出器により影響を受けやすいことから、陽性対照物質への応答の幅を決め、試験の成立を判断すべき。

⑧酵母試験による非水溶性物質の評価については更に検討が必要である。

⑨被験物質を増やして更に多施設でのバリデーションが必要であるか否かについては今後の検討課題である。

### C-2) 皮膚感作性試験代替法の評価

#### 1) 代替しようとする試験法

皮膚感作性試験はモルモットを用いた試験法が一般的に使用されてきた。OECDガイドラインに掲載された方法としては、guinea-pig maximization test (GPMT)およびBuehler assay (BA)がある。これらの試験法は、感作誘発期の皮膚反応を肉眼的に観察・評価することにより、モルモットに対する化学物質の感作性の有無を検出するものである。しかし、評価が主観的であること、試験に5週間を要すること、コストおよび感作誘発による動物へのストレスの問題がある。

Local lymph node assay (LLNA)法はKimberら(1986)により提案された皮膚感作性試験であり、マウス耳介に3日間連続して被験物質を塗布し、6日目に<sup>3</sup>H-methyl thymidineまたは<sup>125</sup>I-iododeoxyuridineを静脈内投与し、5時間後に摘出したリンパ節より調製したリンパ球懸濁液の放射能を測定することにより、局所リンパ節中の細胞増殖反応を評価する試験法であり、溶媒対照群の3倍以上の結果が得られたときに陽性と判定される。この方法は基本的に感作誘導期における反応を調べる方法である。また、従来の方法と比べ、以下のようなメリットがある。

① 験期間が1週間と短い

② 結果が数値として得られるため、客観的かつ定量的

③ リンパ球の増殖は被験物質の量および感作性能に相関して起こるため、用量依存性がある。

④ 動物のストレスを軽減できる

⑤ 使用動物数削減が可能

⑥ コスト削減が可能

⑦ 着色物質の評価が可能

⑧ モルモットと比較し、マウスの免疫系の研究が進んでいる。

⑨ 感作誘導期の評価であるため、将来的にメカニズムの研究や試験法の進歩が期待できる

⑩ GMPTのようにFCAを用いないことから、動物の苦痛を削減できる

これらのメリットから、欧米ではLLNAによる感作性試験・研究が広く行われ、OECDガイドラインとして受け入れられた。EPA, FDA, OSHAも受け入れている。しかし、リンパ節の細胞増殖反応検出に放射性同位元素(RI)標識化合物のDNAへの取り込みを指標として用いていることや、RIをマウスに尾静脈投与するという手技上の問題があり、わが国での普及が妨げられている。

## 2) 申請法について

### 2-1) LLNA-DA 法の原理

LLNA はマウス耳介から吸収された被験物質 (ハプテン) による抗原特異的な T-リンパ球の耳下リンパ節による増殖を RI で標識化合物の核酸成分への取り込みを指標として検出する方法である。一方、申請された LLNA-DA 法は細胞増殖を検出する指標を ATP 含量に変更したものであり、基本的な原理に LLNA と変わるところは無い。

### 2-2) LLNA-DA 法のプロトコール

LLNA-DA 法のプロトコールを以下に要約する。

使用動物：出産経験の無い雌 CBN/JN 系マウス  
投与群設定：溶媒を用いる陰性対照、陽性対照 (10% Eugenol, または 15% Hexyl cinnamic aldehyde)、および 3 用量以上の被験物質

群あたり動物数：1 群あたり 3 匹以上 (4 匹以上)

溶媒：被験物質が最も良く溶解、あるいは懸濁できる溶媒を用いる。通常 Acetone/olive oil (4:1, AOO), Dimethylformamide (DMF), Methyl ethyl ketone (MEK), propylene glycol (PG), dimethylformamide (DMSO) の順に選択する。

測定指標：ルシフェリン・ルシフェラーゼ法による測定するリンパ球の ATP 含量

試験操作：LLNA-DA 法では 3 日間連続で 1% SDS 処置 1 時間後に被験物質溶液あるいは懸濁液をマウスの両耳介に塗布する。7 日目 (または 6 日目) に 4 回目の塗布を行い、この 24 時間後に両耳下腺リンパ節を取り出し、個体毎に重量を測定したのち、2 枚のスライドグラスにはさんで押しつぶす。それを 0.5mL の PBS 中に入れ、洗い流す。これを攪拌し、膜組織を避けて 20 $\mu$ L サンプルングし、PBS 1.98mL 中に入れ希釈、ATP 測定試料とする。

4 回目の塗布により、対照群と処置群との測定値の比 (SI 値) は顕著に増加する。これは抗原特異的な活性型リンパ球またはメモリー細胞が形成され、それらの急速な増殖が生じていることが考えられる。

即ち、LLNA-DA 法は 4 回目の処置を行うことが LLNA 法と大きく異なっている。

結果の判定：SI 値が 3 以上の時に、感作性陽性とする。

### 2-3) LLNA-DA 法の特徴

LLNA 法と比較し、LLNA-DA 法の特徴は以下のように要約される。

- ① LLNA の原法はリンパ細胞増殖の指標として  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みを測定するが、提案法では RI を使用しない方法として、ATP 含量の増加を指標とした。
- ② リンパ節を摘出し、スライドグラスでつぶすことにより、迅速かつ定量的にリンパ細胞を懸濁できる。
- ③ 10% Eugenol の作用を 9 回の繰り返し実験で検討したが、いずれも SI3 以上の値を示し、再現性がある。
- ④ 感作性物質の識別性は LLNA 法とほぼ同じである。
- ⑤ RI を静脈内投与しないことから実験操作や廃棄物処理が容易である。
- ⑥ ATP 含量を高感度かつ迅速な測定法であるルシフェリン・ルシフェラーゼ法で測定することから、結果が速やかに得られる。

### 2-4) 提案書に記載されたバリデーシオンの種類

提案者の施設で実施されたバリデーシオンのみ。公平な評価を行う上では多施設バリデーシオンの結果が必要である。

### 3) 申請者の行ったバリデーシオンの結果について

#### 3-1) 被験物質の妥当性

被験物質は 17 種類でその内、モルモット試験で陽性と判定されているものが 14 種類、陰性と判定されているものが 3 種類であり、陰性物質が少なかった。

被験物質には、クロルベンゼン類 (DNCB: 2,4-Dinitrochlorobenzene)、アミン類 (pPDA: 4-Phenylenediamine)、カルボン酸 (Trimellitic anhydride, Abietic acid)、アルデヒド類 (cinnamic aldehyde, HCA: Hexylcinnamic aldehyde, Citral)、フェノール類 (Isoeugenol, Eugenol)、Urea 類 (Imidazolidinyl urea)、チオール類 (MBT: 2-Mercaptobenzothiazol)、金属 ( $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiSO}_4$ )、殺菌剤 (Propylparaben)、エステル (Methyl salicylate)、界面活性剤 (Benzalkonium chloride) 等、様々な種類の化学物質が含まれていた。

感作性の程度に関しては、非常に強い感作性物質である、DENB, pPDA、比較的強い感作性物質として、Cinnamic aldehyde, Isoeugenol を、中程度の感作性物質として、

Eugenol および, Abietic acid, Hexylcinnamic aldehyde, Citral, Benzocaine を、また、弱い感作性物質あるいは刺激性物質として、Propylparaben, Methyl salicylate, Benzalkonium chloride が選択されている。なお、LLNA で false negative となる NiSO<sub>4</sub> もリストに加えられている。

以上から、施設内バリデーションでの被験物質の選択はほぼ適切であるが、陰性物質が少なかったことが指摘された。

### 3-2) In vivo データとの対応性

殆どの物質について LLNA-DA 法は LLNA と同じ結果が得られた。今後は陰性物質を増やして再検討する必要がある。

なお、MBT の結果が陰性であったが、Basketter ら (1992) また、DeJong ら (2002) による LLNA の報告では陽性であるし、OECD ガイドライン 429 では、MBT は陽性対照物質として推奨されている。しかし、提案法では 10% で SI 値が 2.0 と有意な増加は見られるものの、3 を超えていなかった。また、LLNA 法と同様に金属塩の検出感度が良くない。

### 3-3) データの信頼性

主たる提案者は皮膚感作性試験について 1997 年より経験がある。また、申請法には技術的に特に困難と思われる所は無い。従って、技術面でデータの信頼性に関する問題は無いと考えられる。また、申請者の属する安全性試験施設は GLP 認定施設であり、GLP 試験に準じた試験操作に習熟しているものと思われた。プロトコールは適切に記述されており、施設内バリデーションの結果も適切にまとめられた。個別データの確認も行えた。これらのことから施設内バリデーションは「GLP 精神に準じて、試験が実施された」と見なして良いと考えた。但し、チェックしたデータは 2 次データであり、生データレベルでの確認は行っていない。試薬調製記録の確認も行っていない。

### 3-4) 施設内再現性

Isoeugenol について、9 回の繰り返し実験を行っていた。その結果によれば、リンパ節重量の対照群との比 (SI 値) に大きな差は無く、また、ATP 含量の SI 値は若干ばらついていたが、陽性物質の基準である SI 値 3 を超えていた。また、SI 値 3 を示す推定濃度 (EC3) も 3 回の繰り返し実験で大きな差は無かった。以上より、申請法の陽性と陰性との識別にお

ける再現性は良いと判断される。

### 3-5) 施設間再現性

多施設でのバリデーションが実施されていない。

### 3-6) 比較対照とした in vivo データの妥当性

Haneke et al (2001) や Basketter et al (1992) という、適切な論文に掲載された LLNA 及びモルモット、及びヒトでの実験結果と比較している。

### 3-7) 試験法の頑健性

マウスは系統によって感作性物質に対する反応が異なることから、適切な系統のマウスを用いるとともに、頻繁に陽性対照を用いて試験を実施し、その反応性を確認する必要がある。ATP 含量測定に用いる試薬はメーカーにより発光度や減衰が異なることから、予試験で定められた適切なプロトコールに厳密に従って実施する必要がある。

### 3-8) 動物福祉面からの妥当性

申請法は in vivo 法であり、完全な代替試験法ではない。しかし、LLNA 法と同様に FCA 処置を行わず、誘発期を含まない方法であることから、動物に与えるストレスが少ない。また、LLNA と異なり尾静脈注射の段階が無く、動物の拘束や苦痛が少ない。また、使用動物数は Maximization 法などの従来法より少ない。

### 3-9) コストからの妥当性

コストの面については詳しい積算は示されていないが、LLNA 法はシンチレーションカウンターという高価な機器が必要であるが、申請法で用いる ATP 測定装置は相対的に安価である。

### 3-10) その他の面からの考察

RI 標識化合物を用いないこと、また、廃棄物処理の手間がかからないという利点があることから、広く日本の安全性試験で利用されることが期待される。

## 4) 評価委員会で審議した主な問題点

### 4-1) LLNA-DA 法の位置づけについて

前項で述べたように、申請法では原報と異なり、6 あるいは 7 日においても被験物質で処理することから、LLNA の代替法と考えるべきか、それとも感作性試験の代替法とするか

検討された。前項の1)で述べたように申請法は原理的にはほぼLLNAと同等であり、その延長線上にあると考えられた。しかし、LLNA-DA法は活性型リンパ球またはメモリー細胞による増殖効果をより増幅していると思われ、量的な違いは確かに存在することから、LLNAの代替法と全く同じとは言えない部分もある。

#### 4-2) LLNA-DA法のプロトコールの問題点について

LLNA-DA法のプロトコールの問題点について検討した結果を以下に示す。

##### ①被験物質の4回目処置について

先に述べたように、6あるいは7日目に4回目に被験物質処理するところがLLNA法とは異なっており、これにより、感作誘導期の反応を捉えるLLNA法とは異なり、感作誘発期の反応も捉えてしまう可能性がある。しかしながら、LLNA法でも耳介に投与された被験物質は3日目以降も、次第に濃度は薄くなりながらも抗原として作用し、6日目まで引き続き抗原感作が継続していると考えられること、LLNAでも4日目からB cellが増えてくること、また、LLNA-DAで処置6日目から8日目におけるリンパ球subsetをフローサイトメトリーで測定し、LLNA法と比較したところ、著明な差は認められなかったことから、LLNA-DA法で得られた結果はLLNAの延長線上にあると考えても良いとされた。

##### ②ATP含量を細胞増殖の指標とした点について

ATPはリンパ節中の非増殖細胞中にも含まれており、ATP含量の変化は必ずしも細胞増殖に平行しているものではない。また、周囲組織のATPも一部測定されてしまう可能性もあるが、スライドグラス上での塗末によりリンパ細胞がうまく分散し、周囲組織を避けて採取できることから、その関与は少ないと考えられる。

##### ③SLS処置について

LLNA-DA法はLLNA法と異なり、1% SLS溶液での前処理を行っている。SLSが被験物質の感作性評価において問題とならないかとの指摘があった。しかし、LLNAで反応が起こるのは、より高濃度のSLSで処置した場合であり、申請法では反応の起きない濃度を用いている。また、感作性を持たない被験物質が、1% SLSによる僅かな細胞増殖活性が影響を与え、結果としてfalse positiveとなるようなケース

についての知見はない。一方、SLSでランゲルハンス細胞の遊走が増加するとされており、1% SLSの影響はEugenol, Isoeugenol及びHCAで約20%のSI値の増加が認められている。これは申請法の感度上昇に役立っていた。

SI値の閾値を下げることにより、SLSを使用しなくとも良いかも知れないとの指摘もあった。しかし、識別値を変えるとその値の妥当性の検討のために大きな追加実験を行わなくてはならなくなることから、非現実的であると考えられた。また、行政上はfalse negativeを一番恐れることから、SLS使用により多少偽陽性が増えるのであっても、それで試験法の感度が上がり、偽陰性が低下するならば、処置の意味はあると考えた。

#### 4-3) プロトコールは詳細かつ適切に書かれているか

プロトコールは詳細に記載されており、一部を除き問題無いと思われた。

#### 5) 特許の状況

多くの者に使用してもらおうよう、特許出願していない。

##### 1) 現時点での総合評価

1) 評価委員会では本法がC-2-3)で示したような特徴を有すること、日本で使用しにくいRI標識化合物を用いない方法であること、また、簡便かつ迅速に結果が得られるにも関わらず、原法であるLLNAとほぼ同等の結果が得られていることから、見込みある方法であると判断し、多施設バリデーションでより詳細なデータを得た上で更に評価する必要があると考えた。

1) 申請法は感作誘導期の反応を主に捉える方法であるが、誘発反応も一部見られるかも知れない。

2) 被験物質の適用範囲としては、LLNA法と同様に金属類への感度が低い。

3) 詳細なプロトコールが用意されている。また、今回の評価委員会の指摘を踏まえ、微細な修正が行われる予定である。

4) 結果の判定方法の妥当性については、SI値3が識別値になるように、SLS前処置を加えてある。その必要性については議論があったが、特に、感作性試験法として不適切とは言えない。

5) ATP測定を時間的に正確に行わなければならないが、その他の点については、比較的容易に実行できるものと思われる。

6) 今回のデータから見るとLLNA-DA法はLLNA原法からそれほど乖離していることは無く、局所でLLNA原法と異なる事象がおきているとは考えられず、LLNA-DA法はLLNA法の延長線上にあると考えても良い。

7) 今後行われる多施設バリデーションのあり方について

以下のように考えられた。

0 Core laboratoryはダイセル化学に努めてもらい、プロトコルを作成してもらう。また、技術トランスファーを実施してもらう。

0 バリデーションに協力してもらう機関はLLNAを行ったことがあり、ATP測定装置を有する機関とするのが良い。

0 試験期間を1月程度としたとき、1機関で実施可能な被験物質数はプロトコルの内容によって異なるが、陽性対照、陰性対照、被験物質2個(1用量)とする実験が1週間で可能であることから、これを三回繰り返すとして、6検体まで可能であろう。

0 一群当りの動物数は提案法では3匹であるが、これだと1匹がずれた場合の処理が困難であり、また、LLNA-DAは動物数を減らす事を主眼とした代替法ではないことから、原法通りの4匹が良い。

0 用量を振る場合は、公比10、3用量で行うのが良い。

0 被験物質候補リストはダイセル化学工業の協力を得て作成する。

0 初めはバイアスがなるべく少なくなるように、条件を揃えて実施するのが良い。

#### D) 新しい代替法の募集

班会議では、新たな代替試験法を募集することについて検討し、本研究班が平成16年度以後継続するとの保証は無いが、場合によっては研究班で評価されない可能性を明示した上で募集したところ、昨年に続き、放射性同位元素を用いない皮膚感作性試験代替法としてLocal Lymph Node Assay (LLNA)の変法(LLNA-BrdU法)が化学物質評価機構より提案された。これを班会議で審議した結果、平成17年度に検討するとされた。

#### E. まとめ

1) 資生堂より提案された酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリーを評価委員会で評価した結果、ほぼ3T3-NRU光毒性試験法と同等の

performanceを持つと思われたが、陽性対照に対する反応が小さく、改善が必要であるとされた。

3) 放射性物質を用いない感作性試験代替法であるLLNA-DAを評価委員会で評価し、LLNAと同等のperformanceを持つとともに、簡便かつ迅速に結果が得られる方法であると評価された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 添付資料

1) 吉村 功, 日本動物実験代替法学会バリデーション委員会委員長 光毒性試験代替法についての答申(2004. 8. 28)

2) 日本動物実験代替法学会評価委員会 評価報告書(中間報告)「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリー」(2005. 3)

3) 日本動物実験代替法学会 評価委員会、ダイセルより提案のあった皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA法)の一次評価報告(2005.3)

#### H. 研究発表

##### 1. 論文発表

0) 大野泰雄、動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受け入れの現状. 国立医薬品食品衛生研究所報告 122, 1-10, 2004

0) 大野泰雄、日本における動物実験代替法の開発と活動状況. *Fragrance J.* 33, 1-14, 2005.

0) K. Toda, S. Ishida, K. Nakata, R. Matsuda, S. Ozawa, J. Sawada, Y. Ohno, K. Inoue, K. Shudo and Y. Hayashi: Improvement in reliability of probabilistic test of significant differences in GeneChip experiments. *Anal. Sci.*, 20, 731-733, 2004.

0) Hongo T, Kajikawa M, Ishida S, Ozawa S, Ohno Y, Sawada J, Umezawa A, Ishikawa S, Kobayashi T, and Honda H: Three-Dimensional High-Density Culture of Hep G2 Cells in a 5-ml Radial-flow Bioreactor for Construction of Artificial Liver. *J. Bioscience and Bioengineering*, 99, No 3, 237-244, 2005

0) 大野泰雄他、Balb/c 3T3細胞を用い

neutral red 取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価結果報告、AATEX 2005, in print.

## 2. 学会発表

- 1) Yasuo Ohno, GLP regulation in Japan, Korea and China and Its Contribution to Animal Welfare, "Balancing Animal Welfare and Regulatory Compliance Issues in Preclinical Studies" supported by FDA, NIH, USDA, AALAC. Detroit Metropolitan Airport Westin Hotel, June 29-30, 2004.
- 2) 本郷有克、梶河真理子、石田誠一、小澤正吾、大野泰雄、澤田純一、梅沢 彰、石川陽一：高密度 3 次元培養時におけるヒト肝ガン由来細胞 HepG2 の機能評価 第三回日本再生医療学会総会 (2004. 3)
- 3) 本郷有克、梶河真理子、石田誠一、小澤正吾、大野泰雄、澤田純一、梅沢 彰、石川陽一：高密度 3 次元培養時におけるヒト肝ガン由来細胞 HepG2 の機能評価 日本生物工学会平成 16 年度大会 名古屋 (2004)
- 4) 宮島敦子、小澤正吾、何晋徳、田中宏昌、仲井健也、篠内桃子、上川雄一郎、窪田敬一、緒方宏泰、大野泰雄。ヒト肝における CYP1A, 2B, 2C, 3A 遺伝子および関連核内受容体遺伝子の発現量の個体差。日本薬学会第 125 年会 (横浜) 2005 年 3 月
- 5) 田中憲徳、板垣宏、今井弘一、大野泰雄、大森 崇、岡本裕子、川端留美、小島肇夫、土肥孝彰、藤田百合子、畑尾正人、笛木修、若栗忍、吉村 功：酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験を用いた光阻害試験：バッテリーのバリデーション及び評価委員会での検討中間報告、日本動物実験代替法学会、2004 年 11 月、長崎
- 6) 吉村 功、板垣 宏、大野泰雄、大森 崇、

岡本裕子、川端留美、小島肇夫、田中憲徳、谷川浩子、土肥孝彰、長谷川靖司、藤田百合子、穂谷昌利、森 真輝、若栗 忍、：酵母-赤血球試験の光毒性試験代替法としてのバリデーション研究、日本動物実験代替法学会、2004 年 11 月、長崎

- 7) 大野泰雄他。皮膚三次元モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法のバリデーション。日本代替法学会学術年会、第 33 回日本環境変異原学会第 18 回日本動物実験代替法学会合同学術大会、長崎ブリックホール、長崎、2004. 11. 30- 12. 2.
- 8) 田中憲徳、大野泰雄他。酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験を用いた光毒性試験バッテリーのバリデーション及び評価委員会での検討中間報告。日本代替法学会学術年会、第 33 回日本環境変異原学会第 18 回日本動物実験代替法学会合同学術大会、長崎ブリックホール、長崎、2004. 11. 30- 12. 2.
- 9) 吉村功、大野泰雄他。酵母赤血球試験の光毒性試験代替法としてのバリデーション研究。日本代替法学会学術年会、第 33 回日本環境変異原学会第 18 回日本動物実験代替法学会合同学術大会、長崎ブリックホール、長崎、2004. 11. 30-12. 2.

H. 知的所有権の取得状況  
無

## I. 謝辞

本研究の遂行にあたっては日本動物実験代替法学会の評価委員会(田中憲徳委員長)とバリデーション委員会(吉村 功委員長)、バリデーション参加機関、及びそれぞれに属する委員及び職員の方々のお世話になった。ここに感謝申し上げる。



## 光毒性試験代替法についての答申

日本動物実験代替法学会代替法評価委員会  
委員長 田中憲穂殿

2003年7月29日の代替法評価委員会とバリデーション委員会の合同委員会で、代替法評価委員会からバリデーション委員会に付託された「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリーの施設間バリデーション」について、実行委員会を組織して研究を進めていたところ、2004年8月27日付で、その研究の報告書が提出されました。

バリデーション委員会では、この報告書が、付託された研究について適切な結果を提示したものと判断し、これを代替法評価委員会に提出します。

この報告書に基づいて当該代替法の評価を行うよう答申いたします。

2004年8月28日

日本動物実験代替法学会バリデーション委員会  
委員長 吉村 功

添付文書

光毒性試験代替法バリデーション研究報告書（一式）

# 光毒性試験代替法バリデーション研究 報告書

2004年8月27日

光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会  
委員長 吉村 功

## 1. はじめに

日本動物実験代替法学会代替法評価委員会（以下「評価委員会」という）は、2003年7月29日、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会（以下「バリデーション委員会」という）に、「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリー（以下「酵母-赤血球試験」）の施設間バリデーションを行うことを要請した。（別添え資料1「合同委員会議事録」を参照のこと。）

バリデーション委員会は、要請に応じるため、別添え資料2「光毒性試験代替法バリデーション研究試験計画書」（以下、計画書の添付資料も含めて「計画書」という）に述べるように、「光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会」（以下「実行委員会」という）を組織し、2003年10月16日に研究を開始した。

実行委員は、

板垣宏、大野泰雄、大森崇、岡本裕子、川端留美、小島肇夫、田中憲徳、土肥孝彰、

藤田百合子、穂谷昌利、森真輝、吉村功（委員長）、若栗忍

の13人で、その所属等は計画書の添付資料の通りである。

実行委員会は、計画書にそって、2003年11月13,14日に食品薬品安全センター（秦野）で技術研修会を開催した。実験参加施設への機材送付等は、大野が2003年度末までに行った。実験参加施設は2003年中に実技復習を行い、2004年1月から4月中旬までの間に実験を終え、データを解析担当者の大森に送付した。大森はデータクリーニング・解析を行った上、2004年5月7日の検討会に結果を報告した。

本報告書は、検討会後に補足されたことを含めて、研究全体の内容をまとめたものである。

## 2. 研究課題

本研究が解答を与えるべき主要課題は、酵母-赤血球試験の結果が施設間でどの程度変動するか、多施設試験を行って定量的に把握することである。副次課題は、提案されている酵母-赤血球試験の標準手順（standard operating procedure; SOP）の各指示、とりわけ陽性・陰性の判定法が適切かどうかを吟味することである。

## 3. 研究の遂行

研究はほぼ計画書にそって遂行された。

### 3-1) 実験施設

実験を行った施設は、公募に応じた次の6施設で、括弧内は実験担当者である。

(株)コーセー研究本部品質保証センター（岡本裕子、谷川浩子）

(株)資生堂安全性・分析センター（森真輝、穂谷昌利）

(財)食品薬品安全センター秦野研究所（若栗忍）

東洋ビューティ（株）中央研究所（藤田百合子）

日本メナード化粧品（株）総合研究所（長谷川靖司）

マルホ（株）京都 R&D センター（土肥孝彰）

### 3-2) 被験物質

被験物質は表 1 に示す 16 物質から、9 物質を大野が選択しコード化した。

各施設には、表 2 中に○で示された 6 物質が、物質名及び光毒性の有無を隠して、酵母光生育阻害試験の陽性対照 (8-Methoxypsoralen)、赤血球光溶血試験の陽性対照 (Acridine) と共に配布された。

これらの物質名・施設名は 2004 年 5 月 7 日の検討会で明らかにされたが、本報告書では施設名を a,b,..., f というコードで表し、どのコードがどの施設であるかを示さないことにした。

以下では、「陽性」「positive; P」「+」を全く同じものとして、説明文では「陽性」を使い、表での省略形を「P」とする。「擬陽性」「equivocal; E」「+/-」や、「陰性」「negative; N」「-」についても同様である。

表 1 被験物質候補となった 16 物質と *in vivo* での評価

物質名	<i>In vivo</i> 判定			物質名	<i>In vivo</i> 判定		
	本バリ デーション 採用の 評価	資生堂 評価(評 価点)	EU/ COLIPA 採用の評 価		本バリ デーション 採用の 評価	資生堂 評価 (評価 点)	EU/ COLIPA で採用さ れた評価
Amiodarone	P		P	4- <i>t</i> -Butyl-4-methoxydibenzoylmethane(BM DM)	N	N(0)	
Anthracene	P	P(1.8)	P	Musk ambrette	N	N(0.7)	N
Bithionol	N	N(0)	P	Piroxicam	N	N(0)	N
Chlorhexidine(C HD)	N		N	Rose bengal	N	N(0)	E
Chlorpromazine (CPZ)	P	P(1.6)	P	3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide(TCSA)	P	P(1.5)	
5-Methoxypsoralen(5-MOP)	P	P(2.7)	P	8-Methoxypsoralen(8-MOP)	P	P(4.8)	P
Sodium lauryl sulfate(SLS)				6-Methylcoumarin(6-MC)	N	N(0)	P
2-Ethylhexyl- <i>p</i> -dimethylaminobenzoate(EDA)	E	E(1.0)		Acridine	P	P(2.1)	P

注：資生堂の *in vivo* 判定はモルモットの結果、ECVAM, EU/COLIPA の判定はヒトの結果によっている。*In vivo* 判定において、空白はデータなし、である。

資生堂判定についての文献：

- (1) Sugiyama, M., et al. (1994a) In vitro assays to predict phototoxicity of chemicals: (I) Red blood cell hemolysis assay. *Alternative to Animal Testing and Experimentation*, 2, 183-191.
- (2) Sugiyama, M., Itagaki, H. and Kato, S. (1994b) In vitro assays to predict phototoxicity of chemicals: (II) Yeast growth inhibition assay and battery system with photohemolysis assay. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, 2, 193-202.

EU/COLIPA の *in vivo* 判定についての文献：

- (1) Spielman H., et al. (1994) EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: first results obtained with a balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicology in Vitro*, 8(4), 793-796.
- (2) Spielman H., et al. (1998) The international EU/COLIPA in vitro phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial). part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology*

*in Vitro*, 12(3), pp. 305-327.

- (3) Spielman H., et al. (2000) The second ECVAM workshop on phototoxicity testing. *Alternatives to Laboratory Animals*, 28(6), 777-814.

表2 選択した9被験物質と各施設への割り付け。○印が該当被験物質を割り当てた施設

被験物質名	コード	<i>in vivo</i> 判定	施設コード					
			a	b	c	d	e	f
Anthracene	A	P	○	○	○	○	×	×
Amiodarone	B	P	○	○	○	○	×	×
CHD	C	N	○	○	○	○	×	×
CPZ	D	P	○	○	×	×	○	○
Bithionol	E	N	○	○	×	×	○	○
SLS	F	N	○	○	×	×	○	○
Acridine	G	P	×	×	○	○	○	○
6-MC	H	N	×	×	○	○	○	○
BMDM	I	N	×	×	○	○	○	○

### 3-3) 光源

太陽光のシミュレーション光源については、6施設がそれぞれ1台のDr. Hönle社のSOL500を用いた。

### 3-4) 吸光度の波長

赤血球光溶血試験で光溶血度を測定する際の吸光度測定は波長540nmと525nmの2種類で実施したが、主解析を540nmフィルターの測定値に基づくことにした。525nmでの測定が測定機器の関係で困難なときは、520nmあるいは530nmで代用することを認めた。これについては後で考察する。

### 3-5) 実験条件の記録

GLP準拠で実験することにしたので、すべての実験施設が、そこで定められている測定機器や実験条件などの記録のコピーを大野に送付した。

## 4. 実験データの管理と解析

### 4-1) データ量

実験で得られたデータは各施設から、大森と吉村に送られた。

そのファイル数は、本実験と予備実験をあわせて、酵母光生育阻害試験が228、赤血球光溶血試験が192であった。データ解析は大森が担当した。前記検討会に提出された資料、及びその後の追加資料は別添え資料3「データ解析報告書」の通りである。以下の説明はこの報告書を要約したものであるから、詳細についてはこの報告書で確かめることができる。

### 4-2) データクリーニング

大森は、各施設から送られたデータを吟味し、酵母光生育阻害試験の39ファイル、赤血球光溶血試験の183ファイルについて、生じた疑問点を問い合わせ、必要な修正を行った。その内容は

- (1) 必要なデータが入力されていない (16件),
- (2) 規定したフォーマット形式にデータが入力されていない (1件),

- (3) プロトコルや事前に決められたルールに適合していない (48 件),
- (4) 単純な入力ミス (6 件),
- (5) 試験実施施設からの誤りであるとの報告 (3 件),
- (6) 紙媒体で提出されたデータと電子媒体で送られてきた結果が一致しない (54 件),
- (7) その他 (94 件)

であった。

データクリーニングを行ってデータを固定した後、被験物質コードが大野より大森に開示された。施設コードと被験物質コードが実行委員会に開示されたのは、2004年5月7日検討会である。

#### 4-3) 結果の判定規則

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験のそれぞれの SOP にもとづいて、各試験で2回の本実験が行なわれた。2回の結果が大きく異なった場合は追加実験が1回行なわれているので、本実験の中で追加実験結果に近い方を当該試験での評価結果とした。

本研究の結果判定としては、表3に示すように、2試験のどちらかで陽性と判定された被験物質を光毒性「陽性」、擬陽性と陰性の組み合わせになった被験物質を光毒性「擬陽性」、両試験で陰性と判定された被験物質を光毒性「陰性」とした。

表3 二つの試験からの総合判定の規則

		赤血球光溶血試験		
		陽性	擬陽性	陰性
酵母光生育 阻害試験	陽性	陽性	陽性	陽性
	擬陽性	陽性	擬陽性	擬陽性
	陰性	陽性	擬陽性	陰性

#### 4-4) 施設内再現性

本研究の主要課題は施設間再現性の検討であるが、施設内で再現性がなければ施設間再現性の吟味が無意味になる。そこでまず施設内再現性を吟味した。

すなわち、本実験の2回の結果を、1回づつ別々の2試験とした組み合わせについて、2回の判定結果が同じかどうかを調べた。その結果、表4に示した場合には、実験を反復したときに異なる結果が生じる可能性があることが分かった。

施設bで特に再現性が悪かった理由について検討したところ、施設bでは、実験器具の関係で、実験者の使い慣れた実験室ではなく、他施設を借用して実験を行っていた。そのため、例えば光照射による温度変動を制御するのが困難という条件が生じていた。これによって結果が不安定となり、他の実験施設と異なる結果を導いたものと思われる。次項で施設間差を評価するときは、これを考慮に入れて検討を行う。

施設cの物質Hについては、赤血球光溶血試験で1回目と2回目が大きく異なった結果が得られたためであるが、追加実験でこれが補正されているので次項の検討には影響しないと考えられる。施設cの物質Bについては、結果としての陰性と擬陽性の違いはあるが、測定値としては、それほど大きな差ではないので、酵母-赤血球試験にある程度の施設内再現性が認められたものとして施設間再現性を検討する。

表4 施設内の実験反復で結果が異なる可能性のある施設・被験物質組み合わせ

施設	被験物質	可能性
b	A	E または P
	B	N または E
	C	E または P
	D	N または E または P
	F	N または P
c	B	N または E
	H	N または P

4-5) 施設間再現性および *in vivo* 判定との類似性

酵母-赤血球試験による判定結果をまとめると表 5 が得られる。施設 b を除いて考えると、陽性と陰性が混在する物質はない。物質 A, B, D で陽性と擬陽性が混在、物質 H で陰性と擬陽性が混在している。この擬陽性をどう考えるかが、施設間再現性の評価を左右する。

これについて実行委員会では、後で考察するように、カットオフ値の変更と用量相関性を考慮に入れた判定が必要であるという意見が出たが、これによって十分な再現性があるという結論には至らなかった。

この結果を *in vivo* 判定と比べると、表 6-1, 6-2 が得られる。前者は施設 b を除いた場合、後者は施設 b を含めた場合である。

表 6-1,2 において採用している指標の定義は次の通りである。

感度 I：陽性物質を陽性と判定した割合

感度 II：陽性物質を陽性または擬陽性と判定した割合

特異度：陰性物質を陰性と判定した割合

一致度 I： *In vivo* 判定と実験判定が一致した割合

一致度 II：擬陽性判定を陽性判定とみなしたときに *in vivo* 判定と実験判定が一致した割合

表 6-1,2 においては、感度 II がかなり大きな値であるのに、特異度は小さな値であることが目立っている。その主たる原因は、物質 C, H の *in vivo* 判定が陰性なのに、実験判定のほとんどが陽性または擬陽性であることである。

まず物質 C の *in vivo* 判定の根拠を表 1 で見ると、ここでは判定が文献によるものであって実験値が明瞭には示されていない。この判定の妥当性の再検討が必要である。

次に物質 H の実験データを見ると、擬陽性を示した 3 施設の全てにおいて、酵母光生育阻害試験での反応が、カットオフ値ぎりぎり擬陽性になっている。従って、現在設定されているカットオフ値の妥当性の再検討が必要である。

表 5 施設間再現性 (P：陽性, E：擬陽性, N：陰性)

被験物質	コード	<i>In vivo</i> 判定	施設					
			a	b	c	d	e	f
Anthracene	A	P	P	E	E	P		
Amiodarone	B	P	P	N	P	E		
CHD	C	N	P	P	P	P		
CPZ	D	P	P	E			E	P
Bithionol	E	N	P	P			P	P
SLS	F	N	N	P			N	N
Acridine	G	P			P	P	P	P
6-MC	H	N			N	E	E	E
BMDM	I	N			N	N	N	N

表 6-1 *In vivo* 判定に対する実験判定の類似性 (施設 b を除いた場合)

	施設コード					平均
	a	c	d	e	f	
感度 I	3/3 (100%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)	10/13 (77%)
感度 II	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	13/13 (100%)
特異度	1/3 (33%)	2/3 (67%)	1/3 (33%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)	8/17 (47%)
一致度 I	4/6 (67%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	4/6 (67%)	18/30 (60%)
一致度 II	4/6 (67%)	5/6 (87%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	21/30 (70%)

表 6-2 *In vivo* 判定に対する実験判定の類似性 (施設 b を含めた場合)

	施設コード						平均
	a	b	c	d	e	f	
感度 I	3/3 (100%)	0/3 (0%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)	10/16 (63%)
感度 II	3/3 (100%)	2/3 (67%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	15/16 (94%)
特異度	1/3 (33%)	0/3 (0%)	2/3 (67%)	1/3 (33%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)	8/20 (40%)
一致度 I	4/6 (67%)	0/6 (0%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	4/6 (67%)	18/36 (50%)
一致度 II	4/6 (67%)	2/6 (33%)	5/6 (83%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	23/36 (64%)

## 5. 考察

### 5-1) 各被験物質の実験結果の特徴

個々の実験での判定について解析者がまとめた特徴は表 7 の通りである。それぞれ注意点があるので、SOP の改訂や今後のバリデーション研究での被験物質選択において参考にすべきと思われる。

赤血球光溶血試験では、陽性対照が陽性にならないという現象がいくつかの施設で見られた。穂谷がその原因を調べたところでは、当初予定していた Veronal buffer と Sigma 社製 acridine をそれぞれ PBS(-) と東京化成社製 acridine に変更したことが影響し合ったため、前者で用意した SOP のままでは、光溶血性反応が不十分になる例が生じたためのものである。

これについては更に検討を進め、SOP の改訂に反映させるべきであろう。

表 7 データに表れた被験物質の特徴

	酵母光生育阻害試験	赤血球光溶血試験 (540nm)	In vivo
物質 A	・施設 a での差がやや大 ・施設 b のばらつき大	・施設 d の陽性という判定はカット オフ値ぎりぎり	・陽性
物質 B	・施設 a,c,d では用量反応があるが、施設 b では傾向がない	・全施設で用量反応がない	・陽性
物質 C	・照射・非照射で用量反応あるが差では用量反応が不明確	・全施設で陽性 ・非照射でも用量反応あり ・施設 b での再現性が無い	・陰性
物質 D	・照射・非照射で用量反応あり ・施設 a で照射・非照射の差がやや大	・施設 a,b,e で非照射の溶血度が 大 ・全施設で非照射での用量反応があり、照射に対する関係が複雑	・陽性
物質 E	・施設 a で差が大 ・差の用量反応は不明確	・全施設で明確に陽性 ・非照射でもやや反応あり	・(資)陰性、 (E/C)陽性
物質 F	・全施設で用量反応ない	・施設 b のばらつき大	・陰性
物質 G	・全施設で判定が微妙 ・非照射でもやや反応あり	・全施設で陽性 ・非照射での反応がほとんどない	・陽性
物質 H	・全施設で判定が微妙	・全施設で反応がほとんどない ・施設 c は再実験で陰性	・(資)陰性、 (E/C)陽性
物質 I	・全施設で用量反応ない	・全施設で用量反応ない	・陰性

(資)：資生堂，(E/C)：EU/COLIPA

### 5-2) SOP

本研究では、本試験に先立って、SOP への修正提案が実験担当者などから出された。提案の内に示すものは、担当の森、穂谷の検討の後で、SOP の改訂や追加説明に取り入れられた。

- (1) 両試験とも、当初の SOP では、データの記入方法の詳細が明確でなかった。本研究の際には記録用紙のフォーマットを更新した。
- (2) 酵母光生育阻害試験では阻止帯の境界線が不明確な場合が生じた。このような場合の測定方法について SOP の記載を改めた。

提案の内、次に示すものは、今後の SOP 改訂の際に検討すべきことであり、酵母-赤血球試験の評価を行うときは、これについての検討が必要と思われる。

- (3) 用量設定試験や本試験の設定のやり方を SOP に記載すべきである。(注:1月に対応済み。)
- (4) 溶媒選択の方法と理由について、方針を SOP に説明しておくべきである。(注:1月に対応済み。)
- (5) 今回は被験物質を4倍希釈系列で実験したが、この倍率設定の妥当性を検討すべきである。
- (6) 試験の繰り返しの基準を明確にする必要がある。
- (7) 酵母光生育阻害試験では、酵母含有プレートに試薬を含ませたる紙を着装した後の UV 照射までの時間、すなわち寒天培地中への拡散のための時間の設定を SOP に記載することが望ましい。
- (8) 酵母光生育阻害試験では、照射後、試験期間終了まで、ろ紙をそのままにしておくのか、それとも除去するのか明確にすべきである。すなわち、検体の曝露時間を明確にすることが必要である。
- (9) 赤血球光溶血試験では、24穴マイクロプレートから96穴マイクロプレートに移すときの割付方法を SOP に図入りで示しておくことが望ましい。
- (10) 両試験とも SOP が手順の順に書かれていないので、SOP にフローチャートを挿入しておくことが望ましい。(注:1月に対応済み。)
- (11) 両試験とも光照射の有無による結果のみを求めているが、酵母光生育阻害試験では阻止帯の径を、赤血球光溶血試験では溶血度を測定値として記録し、用量反応を確認する判定を検討すべきである。

### 5-3) 判定のカットオフ値

酵母光生育阻害試験では阻止帯の径の差、赤血球光溶血試験では溶血度の差に、陽性・陰性のカットオフ値が定められている。本研究での実験結果によると、後者については SOP での値を変更する必要が感じられなかったが、前者については再検討の必要性が感じられた。

すなわち、酵母光生育阻害試験の判定基準が、以前の論文では2mmであったものが、今回は光源の変更に伴い一致率を高めるためということで5mmとされた。そこで今回の実験では、阻止帯の径差が2mm以上5mm未満の場合を擬陽性としたが、実験結果を見ると、阻止帯のカットオフ値を、例えば3mm~4mmに変更することで施設間再現性が良くなる。酵母光生育阻害試験については、カットオフ値を再検討すべきであろう。

一般に試験法の結果判定では、陽性対照が明確に陽性を示すことが前提になる。それなのに本研究で、各施設から得られた陽性対照の値は、今回設定のカットオフ値5mm付近に密集していた。これは、カットオフ値の再検討が必要であることを示している。

なお、両試験とも光照射の有無における差に対してカットオフ値を設定し、陽性・陰性を判定しているが、酵母光生育阻害試験では阻止帯の径を、赤血球光溶血試験では溶血度を反応値として用量反応を確認し、これも判定に利用する判定方法も検討すべきであろう。

### 5-4) *In vivo* 判定の妥当性

表1の陽性・陰性等の判定において、資生堂の方はモルモットについての測定値によっているが、ECVAM等の方は文献から結果のみを引用したものであり、その根拠となるデータは入手できなかった。被験物質C(Chlorhexidine)の酵母-赤血球試験では、全施設で明確な陽性が見られたにもかかわらず、*in vivo* 判定が逆だったことは *in vivo* 判定の根拠の再確認の必要性を示している。

一致度は *in vivo* 判定を基準にしているので、*in vivo* 判定で擬陽性を考えないで、一致度を評価するときは、実験判定での擬陽性をどちらかに含めるべきであろう。感度と一致度で2種類の指標を検討したのはそのためである。

### 5-5) バッテリーの役割

二つの試験を総合して判定する規則は表3に示したように、陽性>擬陽性>陰性の順で強い判

定の方を採用することになっている。この規則では、先に試験をすることになっている酵母光生育阻害試験で陽性であれば、もう1つの試験はする必要がないが、本研究では、相互関係を確かめることもあって、全ての場合について両方の試験を行うことにした。

結果として、赤血球光溶血試験が必要でなかったかどうかを調べると、表8が得られる。表中で()で囲んであるのが不要だった実験で、太字で示したものが酵母光生育阻害試験の結果を総合判定で変更させた実験である。36実験中14実験で、バッテリーでの判定が酵母光生育阻害試験単独と変わっている。両者の組み合わせであることが大きな意味を持っていると言える。

表8 二つの試験の役割 (P:陽性, G:擬陽性, N:陰性)

物質	施設	酵母	赤血球	総合	物質	施設	酵母	赤血球	総合	物質	施設	酵母	赤血球	総合
A	a	P	(E)	P	B	a	P	(N)	P	C	a	E	P	P
	b	E	E	E		b	N	N	N		b	N	P	P
	c	E	N	E		c	P	(N)	P		c	N	P	P
	d	E	P	P		d	E	N	E		d	N	P	P
D	a	P	(P)	P	E	a	P	(P)	P	F	a	N	N	N
	b	N	E	E		b	E	P	P		b	N	P	P
	e	E	N	E		e	E	P	P		e	N	N	N
	f	N	P	P		f	E	P	P		f	N	N	N
E	c	P	(P)	P	H	c	N	N	N	I	c	N	N	N
	d	E	P	P		d	E	N	E		d	N	N	N
	e	E	P	P		e	E	N	E		e	N	N	N
	f	E	P	P		f	E	N	E		f	N	N	N

### 5-6) 吸光度の測定波長

本研究では、吸光度の測定波長を540nmにすることを標準にしたが、同時に525nm前後の波長でも測定を行った。両者の結果を比較すると、表9が得られる。わずかではあるが、525nm前後で判定の方が感度、一致度の両面で良い結果を与えている。評価の際には、どちらの波長を標準にするかの判断が必要と思われる。

表9 *In vivo* 判定との類似性の吸光度測定波長による違い

左：赤血球光溶血試験での吸光度を540nmで評価、右：525nmで評価(単位は%)

感度I:陽性物質を陽性と判定した割合、感度II:陽性物質を陽性または擬陽性と判定した割合、特異度:陰性物質を陰性と判定した割合、一致度:判定結果が*in vivo*の結果と一致した割合

	施設コード						平均
	a	b	c	d	e	F	
感度I	100	0	67	67	50	100	63.9
感度II	100	67	100	100	100	100	94.4
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致度	67	0	67	50	50	67	50.0
一致度II	67	33	83	67	67	67	64.0

	施設コード						平均
	a	b	c	d	e	f	
感度I	100	67	67	67	100	100	83.3
感度II	100	67	100	100	100	100	94.4
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致度	67	33	67	50	67	67	58.3
一致度II	67	33	83	67	83	67	77.8

### 5-7) SOP 逸脱例

赤血球光溶血試験でSOPから次のような逸脱例が生じたので、その取り扱いを大森、小島、吉村で検討し、以下に示す対処を行った。

(1) 24穴プレートから96穴プレートに分ける際に、実施が2系列でなされなかった。

=> 分けるのは測定のためなので、このデータを本研究のデータとして採用した。

(2) 予備試験と本試験1回目の陽性対照に、自施設で購入したものをを用いたので訂正のために実験を2回追加した。

⇒ 2回目と3回目の測定値を採用した。

(3) 被験物質の濃度設定を誤ったので、新たに2実験を行った。

⇒ 追加した2実験のデータを採用した。

(4) 1回目と2回目が大きく食い違ったので、実験を2回追加した。

⇒ 3回目までのデータを採用した。

#### 5-8) 将来のバリデーション研究における留意点

実験参加者から、将来のバリデーション研究で留意すべきこととして、以下の指摘が出された。

(1) 酵母光生育阻害試験では、判定に個人差がどれくらい影響するかを検討すべきである。

(2) 光毒性試験の施設間変動を調べるバリデーション研究の場合、実験装置のみでなく、実験室の広さや採光・遮光の条件を事前に明確しておくべきである。

(3) 光毒性については、今回の使用したものと異なる光源を用いた場合に結果がどのように変わるか検討すべきである。

(4) 今回の研究では、SOPで光源とフィルターを指定したが、試験法を一般化するときは光源を特定の機器にするのではなく、機器の性能で指定する方が望ましい。その条件を検討すべきである。

(5) 今回は、施設bで実験施設上の問題が生じ、研究結果の解釈にあいまいさを残した。また、陽性対照が確かに陽性反応を示さなかったり、GLP遵守が不十分であったりした例も現れた。今後のバリデーション研究では、技術研修の後で試用試験を行い、実験設備・試薬・技術・SOPの妥当性を再確認し、改善・対処を行うべきである。

(6) 結果論であるが、被験物質Cの*in vivo*判定の妥当性が本研究の大きな焦点となった。今後の研究では、事前に*in vivo*判定の根拠を調べ、それが十分でない物質は被験物質に含めないことが必要である。

## 6. 本研究のまとめ

### 6-1) 酵母-赤血球試験の妥当性

本研究の結果が表6-1にまとめられたとすると、感度IIが100%、特異度が47%、というのが一応の実験結果である。擬陽性を陽性とすれば、陽性物質を誤って陰性といわないという意味で、酵母-赤血球試験の有用性が示されたことになる。

### 6-2) 施設間差

実験条件に問題があった施設bを除けば、施設間の違いは陽性と擬陽性、擬陽性と陰性の範囲に収まっていた。

### 6-3) カットオフ値

赤血球光溶血試験のカットオフ値については特に目立った問題は見られなかったが、酵母光生育阻害試験のカットオフ値には再検討の余地が見出された。これを適切に定めることによって感度を高めることができるかもしれない。

### 6-4) 吸光度の測定波長

実験結果によれば、540nmより525nm前後の波長帯を用いる方が良かったので、SOPでも波長を525nmに変更することを検討すべきである。

### 6-5) 判定方法の改善

2回の実験の再現性吟味と、酵母-赤血球試験での総合判定には用量反応関係を利用する方がよいと思われる。特に非照射下での結果に用量反応関係がある場合は慎重な判定を行うべきである。

### 6-6) GLP遵守

かなり大幅なデータクリーニングが必要であった。GLP遵守を徹底すべきである。

別添資料

1. 代替法評価委員会・バリデーション委員会合同委員会議事録(2003.7.29)
2. 「光毒性試験代替法バリデーション研究試験計画書」(添付資料一式)
3. 「データ解析報告書」(一式)
4. 光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会 議事録(2004.5.7)

## 代替法評価委員会・バリデーション委員会合同委員会議事録

2003年7月29日 文責 吉村 功

出席者：板垣宏，今井弘一，大野泰雄，大森崇，岡本裕子，川端留美，小島肇夫，杉山真理子，田中憲穂，畑尾正人，穂谷昌利，森真輝，吉村功，若栗忍（敬称略）

場 所：東京理科大学工学部吉村研究室

日 時：2003年7月29日（火）午後2時～6時

議 題：光毒性試験代替法のバリデーション研究の遂行について

議事記録：

1. 大野（評価委員）より，代替法評価委員会（以下「評価委」）がバリデーション委員会（以下「バリ委」という）に，「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリーの施設間バリデーション」の実行を求めることになった経緯が簡単に説明された。
2. バリ委は，文書にはなっていないが，この伝達が正式な依頼であると考え，委員会を代表して委員長の吉村が確認の意味を込めた質問を出していった。各委員からも質問や回答があつて，各種質疑応答，議論が進められ，結果として次のことが確認された。
3. バリデーション研究の目的は「今まで単一の施設で有用性が認められたとされている当該試験法が，他の施設でも同様に信頼できる結果を導くかどうか，言い換えれば施設間でどの程度結果がばらつくか，を確認すること」である。
4. バリデーション研究には，実験が必要なので，参加施設を日本動物実験代替法学会として公募する。直近に発行を予定しているニュースレターに公募要領を掲載する。原稿は吉村が準備し，小島（広報委員長）に送る。
5. バリデーションの実行にはバリ委の下部組織として実行委員会（以下「実行委」という）を組織し，実行の詳細を委任する。実行委のメンバーは，バリデーション委員，代替法提案者，バリデーション参加施設代表者，その他の適任者とし，その構成はバリ委が関係者と協議して定める。この最後の文章の趣旨は，バリデーション委員全員が自動的に実行委員になるわけではないこと，実験参加者のどなたを実行委員にするかをバリ委がオーソライズするということである。
6. 一施設で行う実験に必要な費用は，当該施設がすでに持っている設備，要員によって異なるので，バリ委としては見積もらない。実行委は，被験物質試料，マイクロプレート，ペーパーディスク，酵母を用意し当該施設に送付する。その費用はバリ委の負担とする。実験に用いる他の消耗品の費用は実験参加施設の負担とする。
7. 実験の光源・検出器には指定の光源（Dr. Hoenle GmbH 社製）を用いる。資生堂と食品薬品安全センター秦野研究所（以下「食薬研」という）は自己保有の光

源設備を使用し、厚生労働科学研究班所有の3台の設備は実験参加者・施設に貸し出すものとする。検出器の精度確認・校正は、可及的速やかに、田中の手配で、食薬研が行うことにし、設備保有・保管者はこれに連絡・協力する。費用については関係者が相談して決める。試験法提案者の実験では、トプコンの検出器が用いられているので、田中と板垣が補正法について検討する。

8. 公募内容についての質問・問い合わせについては吉村が窓口となって対処する。ただし、試験法自体については、論文「Mariko Sugiyama et al.(2002), A Strategic Approach for Predicting Phototoxicity of Cosmetic Ingredients, AATEX, 9, 29-39.」を参照してもらい、必要に応じて著者に回答を求める。
9. 試験法の SOP 等のプロトコルは大野の責任で逐次改訂を行ない、バリデーション研究の試験計画は吉村の責任で逐次整備を行い、最終的には実行委で確認する。
10. 実験担当者は、自施設において、指定の実施計画に従って実行委から送付された被験物質の光毒性を測定し、結果を実行委に報告する。
11. 実行委は、「コード化した被験物質、酵母、マイクロプレート、ペーパー」をキットとして参加者に送付する。必要に応じて、光源・検出器 (Dr. Hoenle) の貸与の手配をする。
12. 研究スケジュール：
  - 2003年9月30日までに、参加施設確定、実行委確定、基本プロトコル作成
  - 11月中旬に技術研修会を開催
  - 12月末までに各施設が予備実験等の自己研修
  - 2004年1月に試験開始
  - 3月初めまでに進行状況の中間報告
  - 3月末までに、実験者が結果を実行委に報告
  - 6月末までに、実行委が報告書をまとめる
13. 研究成果の公表：研究結果は、実行委員会委員を著者とし、参加施設名を明示して、学術論文にまとめ本学会誌等に投稿する。また、厚生労働科学研究班（大野班）においても報告する。
14. 公募締め切りは2003年9月30日とする。
15. 被験物質の候補は実行委が行うが、最終選定とコード化は、実行委が依頼する個人に委ねる。データが固定された後にコードの公開を行う。この種の秘匿部分に関しては、大野が所属研究所において可能な協力を試みる。その他、結果の信頼性を保持するために実行委の一部で作業グループを構成し、作業を委ねることもある。
16. 実験に必要な労力と時間は、技術の習得状況によって違うが、最大で1人の実験者の3週間分の労力としておけば十分である。
17. 10月16日（木）午後に東京理科大学で実行委を開催する。そこでバリデーション研究の試験計画を完成し了承を取る。ただし、その後も必要に応じて改訂することを可能としておく。