

1
2
3
4
5
6
7

表補 2.3.2 赤血球光溶血試験[52Xnm]の施設間再現性の結果

被験物質名	物質 コード	In vivo の判定	施設コード						In vivoの判 定との一致	
			a	b	c	d	e	f		
アントラセン	A	P	G	P	G	P			2/4	
アミオダロン	B	P	N	N	N	N			0/4	
クロルヘキシジン	C	N	P	P	P	P			0/4	
クロルプロマジン	D	P	P	P			P	P	4/4	
ピチオノール	E	N	P	P			P	P	0/4	
SLS	F	N	N	P			N	N	3/4	
アクリジン	G	P			P	P	P	P	4/4	
6-メチルクマリン	H	N			N	N	N	N	1/4	
Parsol 1789	I	N			N	N	N	N	4/4	
ベータ分布										
平均										
分散										
感度I			33.3	66.7	33.3	66.7	100.0	100.0	0.667	0.074
陽性と判断された物質の数			1	2	1	2	2	2		
In vivoの陽性物質の数			3	3	3	3	2	2		
感度II			66.7	66.7	66.7	66.7	100.0	100.0	0.778	0.025
陽性、擬陽性と判断された物質の数			2	2	2	2	2	2		
In vivoの陽性物質の数			3	3	3	3	2	2		
特異度			33.3	0.0	66.7	66.7	75.0	75.0	0.528	0.076
陰性と判断された物質の数			1	0	2	2	3	3		
In vivoの陰性物質の数			3	3	3	3	4	4		
一致割合			33.3	33.3	50.0	66.7	83.3	83.3	0.583	0.044
In vivoと判定が一致した数			2	2	3	4	5	5		
被験物質の数			6	6	6	6	6	6		

8
9
10

1

2 補 2.4 解析のために作成したプログラム

3

4 本報告のために作成したプログラムを表補 2.4.1 に示す。

5

6 表補 1.5.1 作成したプログラム

プログラム名	機能	出力名	実行日
CHEM_B1_Y1. SAS	酵母光生育阻害試験の施設間再現性の判定を行う SAS プログラム	CHEM_B1_Y1	2004/ 05/13
CHEM_B1_R1. SAS	酵母光生育阻害試験の施設間再現性の判定を行う SAS プログラム	CHEM_B1_R1_ 540、 CHEM_B1_R1_ 52X	2004/ 05/13

7

8

9

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

日時：2004年5月7日（金）14:00～17:00

場所：東京理科大 理窓会館 3階第1会議室（東京，飯田橋）

参加者：

実験施設代表；板垣宏（資生堂），岡本裕子（コーセー），田中憲穂（食薬センター）
土肥孝彰（マルホ），

技術担当；藤田百合子（東洋ビューティ），長谷川靖司（メナード），谷川浩子（コーセー），森眞輝（資生堂），穂谷昌利（資生堂），若栗忍（食薬センター）

評価委員代表：大野泰雄（国立衛研）

バリデーション委員；吉村 功（東京理科大学），大森 崇（京都大学）

オブザーバー；梅田誠（食薬センター）

配布資料：

- 1) 光毒性試験代替法バリデーション研究試験計画書（2003年11月24日改定）
- 2) 光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会報告書（素案）
- 3) 光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会
- 4) 名簿
- 5) 陽性対照の光溶血発現に関する条件の検討
- 6) SOP
- 7) データ解析報告書（ver.1.0）

議事内容

計画書第13項に記載されている検討会

1. 赤血球光溶血試験のプロトコールの変更について

穂谷から、資料 5) に基づきプロトコールの変更についての経緯が説明された。バリデーション研究用に用意した陽性対照のアクリジンを Sigma から東京化成に変更した際に溶血性が両者で異なることがわかり変更にあったとのことである。

これについて以下の議論があった

- ・ プロトコールの照射量が半端な数値になっているのは、強度と総量の取り方が微妙なので、過去のデータから両方を適当な値にしたためと説明された。
- ・ Sigma と東京化成のアクリジンの品質のグレードについて質問があり、これについ

ては穂谷が調べることとされた。

- ・ 光源の強度の意味が装置によって違うのではないかとの意見があった。
- ・ ピボのデータの方にもこのような試薬のロットの影響が出ている可能性があるのではないかとの意見があった。
- ・ 試薬の分析値が確かめられていないとの意見があった。

2. 解析結果について

大森から、資料 7) に基づき解析結果が報告された。

2.1 施設間再現性における SOP での評価方法の変更

施設間再現性の評価において SOP の記載では基本的に平均値の最大値を計算することになっているが、解析を行うにあたり矛盾が生じると判断し、この報告では最大値の平均値を使ったと報告された。ただし、資料 7) にはこの点が未記載になっている。

2.2 施設内再現性の見方

施設内再現性の評価は、判定の組合せにより行ったとの報告があった。

2.3 データクリーニングの結果

データクリーニングの結果が報告された。

2.4 プロトコール違反の対応について

プロトコール違反についての対処はバリデーション委員会の委員で行われたことが報告された。

2.5 酵母光生育阻害試験の結果

- ・ 酵母光生育阻害試験の結果は、施設 a が予備試験では低い値をとっていたが、本試験では高い値をとっていたことが報告された。この原因として、実験者から、予備試験で陽性対照が陽性とならなかったため、本試験では暗幕を用いたとの報告があった。他の施設は暗幕を用いていなかった。暗幕を用いると温度上昇が起こることが問題になるのではないかとの意見が出された。
- ・ 施設 b は、施設内差が大きかったが、これは体育館のような広い場所で実験を行ったために、温度の制御ができなかったためであろう、という報告があった。
- ・ ばらつきの原因は温度だけではなくて、培養温度や、72 時間後の懸濁状況にもある可能性がある、との意見があった。ばらつきの原因について、今後検討していく必要があるのではないかとの意見が出され、森が検討を行うこととなった。

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

日 時：2004年5月7日（金）14:00～17:00

場 所：東京理科大 理窓会館 3階第1会議室（東京，飯田橋）

参加者：

実験施設代表；板垣宏（資生堂），岡本裕子（コーセー），田中憲穂（食薬センター）
土肥孝彰（マルホ），

技術担当；藤田百合子（東洋ビューティ），長谷川靖司（メナード），谷川浩子（コーセー），森眞輝（資生堂），穂谷昌利（資生堂），若栗忍（食薬センター）

評価委員代表：大野泰雄（国立衛研）

バリデーション委員；吉村 功（東京理科大学），大森 崇（京都大学）

オブザーバー；梅田誠（食薬センター）

配布資料：

- 1) 光毒性試験代替法バリデーション研究試験計画書（2003年11月24日改定）
- 2) 光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会報告書（素案）
- 3) 光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会
- 4) 名簿
- 5) 陽性対照の光溶血発現に関する条件の検討
- 6) SOP
- 7) データ解析報告書（ver.1.0）

議事内容

計画書第13項に記載されている検討会

1. 赤血球光溶血試験のプロトコールの変更について

穂谷から、資料 5) に基づきプロトコールの変更についての経緯が説明された。バリデーション研究用に用意した陽性対照のアクリジンを Sigma から東京化成に変更した際に溶血性が両者で異なることがわかり変更にいたったとのことである。

これについて以下の議論があった

- ・ プロトコールの照射量が半端な数値になっているのは、強度と総量の取り方が微妙なので、過去のデータから両方を適当な値にしたためと説明された。
- ・ Sigma と東京化成のアクリジンの品質のグレードについて質問があり、これについ

- ・試験結果に施設間差がみられたことから、被験物質と陽性対照との比を評価指標としてはどうかとの意見が出された。この点については、大森が追加解析を行うこととなった。
- ・施設 b の被験物質 B のみが陽性物質を陰性と判断したことについて、物質を間違えて報告したわけではないとの説明があった。これについては、陽性対照がきちんと陽性に判定されているかどうかを確認してはどうかとの意見が出され、大森が確認することとなった。
- ・この試験のグレーゾーンが広いのではないかと意見が出されたが、この結果を見る限り、ばらつきを検討することが先であるであろうとの意見が出された。

2.6 赤血球光溶血試験の結果

- ・540nm を用いるよりも 525nm を用いる方が若干陽性物質を陽性と判定する傾向があることが報告された。これについては、変成が削除されるから 525nm の方がよいのではないかと意見があった。

2.7 その他

日本では GLP 完全対応の試験ができないが、各施設が GLP に準拠して提出前に各種記録をチェックすることが大切だとの意見があった。

3. 今後の予定

今後の予定についての議論がなされた

3.1 厚生労働省への報告

厚生労働省への報告は、今回の報告中の結果の部分を利用して大野が作成することとされた。

3.2 結論の作成

本研究の結論については、バリデーション委員が中心となって今回の結果と議論に基づいた原案を作成し、実行委員にメールで配布して意見をまとめてまとめることとされた。

これらをまとめた結論、研究計画書 (SOP を含む)、データ解析報告書を評価委員会へ提出する資料とすることとされた。

3.3 論文化

- ・研究全体の論文を作成して ATLA に投稿をすることとされた。(原稿を用意する責任者は吉村)
 - ・各試験法の詳細について、論文を作成して AATEX に投稿することとされた。(原稿を用意する責任者は板垣)
 - ・データクリーニングについて論文を作成し、しかるべき雑誌に投稿することとされた。(原稿を用意する責任者は大森)
- 以上

ては穂谷が調べることにされた。

- ・ 光源の強度の意味が装置によって違うのではないかとの意見があった。
- ・ ビボのデータの方にもこのような試薬のロットの影響が出ている可能性があるのではないかとの意見があった。
- ・ 試薬の分析値が確かめられていないとの意見があった。

2. 解析結果について

大森から、資料 7) に基づき解析結果が報告された。

2.1 施設間再現性における SOP での評価方法の変更

施設間再現性の評価において SOP の記載では基本的に平均値の最大値を計算することになっているが、解析を行うにあたり矛盾が生じると判断し、この報告では最大値の平均値を使ったと報告された。ただし、資料 7) にはこの点が未記載になっている。

2.2 施設内再現性の見方

施設内再現性の評価は、判定の組合せにより行ったとの報告があった。

2.3 データクリーニングの結果

データクリーニングの結果が報告された。

2.4 プロトコル違反の対応について

プロトコル違反についての対処はバリデーション委員会の委員で行われたことが報告された。

2.5 酵母光生育阻害試験の結果

・ 酵母光生育阻害試験の結果は、施設 a が予備試験では低い値をとっていたが、本試験では高い値をとっていたことが報告された。この原因として、実験者から、予備試験で陽性対照が陽性とならなかったため、本試験では暗幕を用いたとの報告があった。他の施設は暗幕を用いていなかった。暗幕を用いると温度上昇が起こることが問題になるのではないかとの意見が出された。

・ 施設 b は、施設内差が大きかったが、これは体育館のような広い場所で実験を行ったために、温度の制御ができなかったためであろう、という報告があった。

・ ばらつきの原因は温度だけではなくて、培養温度や、72 時間後の懸濁状況にもある可能性がある、との意見があった。ばらつきの原因について、今後検討していく必要があるのではないかとの意見が出され、森が検討を行うこととなった。

- ・試験結果に施設間差がみられたことから、被験物質と陽性対照との比を評価指標としてどうかとの意見が出された。この点については、大森が追加解析を行うこととなった。
- ・施設 b の被験物質 B のみが陽性物質を陰性と判断したことについて、物質を間違えて報告したわけではないとの説明があった。これについては、陽性対照がきちんと陽性に判定されているかどうかを確認してどうかとの意見が出され、大森が確認することとなった。
- ・この試験のグレーゾーンが広いのではないかと意見が出されたが、この結果を見る限り、ばらつきを検討することが先であるであろうとの意見が出された。

2.6 赤血球光溶血試験の結果

- ・540nm を用いるよりも 525nm を用いる方が若干陽性物質を陽性と判定する傾向があることが報告された。これについては、変成が削除されるから 525nm の方がよいのではないかと意見があった。

2.7 その他

日本では GLP 完全対応の試験ができないが、各施設が GLP に準拠して提出前に各種記録をチェックすることが大切だとの意見があった。

3. 今後の予定

今後の予定についての議論がなされた

3.1 厚生労働省への報告

厚生労働省への報告は、今回の報告中の結果の部分を利用して大野が作成することとされた。

3.2 結論の作成

本研究の結論については、バリデーション委員が中心となって今回の結果と議論に基づいた原案を作成し、実行委員にメールで配布して意見をまとめてまとめることとされた。

これらをまとめた結論、研究計画書 (SOP を含む)、データ解析報告書を評価委員会へ提出する資料とすることとされた。

3.3 論文化

- ・研究全体の論文を作成して ATLA に投稿することとされた。(原稿を用意する責任者は吉村)
- ・各試験法の詳細について、論文を作成して AATEX に投稿することとされた。(原稿を用意する責任者は板垣)
- ・データクリーニングについて論文を作成し、しかるべき雑誌に投稿することとされた。(原稿を用意する責任者は大森) 以上

「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」
評価報告書
(中間報告)

日本動物実験代替法学会
評価委員会

委員長
田中憲穂(2004.12.31 まで)
大野泰雄(2005. 1. 1 より)

中間報告の要旨

提案者からの提出データに基づき、評価委員会での一次評価を行った。その結果、提案法の利点は以下のとおりと考えた。①実験方法に培養細胞を用いていないので試験法が比較的簡便である、②水難溶性物質に対しても適応可能である、③化粧品や化粧品原料だけでなく、広く一般の化学物質にも使用可能である、④特性の異なる2種の試験法の組合せによって異なる毒性機序に基づく光毒性を検出可能である、⑤光毒性物質の予知の際に最も困る false negative は出ない。一方、提案法には以下の問題点がある。①提案法で捉えられるものは光増感作用のある物質である。光感作性については、この試験法で陽性と評価された物質を光蛋白結合性等の他の試験法で評価することが必要である。②陽性結果が得られた物質を産業的に利用する場合には、リスク評価を行うための試験が必要である。③酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験とのバッテリーを組む必要性について、更に検討する必要がある。④多施設でのバリデーション結果が無い。これらを OECD で承認された光毒性試験代替法である 3T3-NRU 法とも比較し、総合的に判断し、光毒性の有無を判断することを目的とする化学物質のスクリーニングに有用と思われた。これらを踏まえ、日本動物実験代替法学会に提案法の多施設によるバリデーションを依頼した。

多施設バリデーションは施設間のばらつきを評価することを目的として実行された。in vivo 試験結果との対応性について詳細な検討を行うためには多数の被験物質が必要であるが、それは実施困難であることから、バリデーション目的として、施設間のバラツキ評価を優先すべきとされ、被験物質の数や種類を絞られた。多施設バリデーション結果は以下のとおり。①提案法は擬陽性を陽性とした場合、感度が 100%、特異度が 47%であり、擬陽性を陽性とするれば、陽性物質を誤って陰性といわないという意味で有用性である。②光毒性試験に関する経験と実験条件に問題があった1施設を除けば、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おり、施設間差は小さい。③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ある。④溶血性を判定するための吸収波長はヘモグロビン吸収の極大波長である 540nm より、変性の影響を受けにくい 525nm 前後の波長帯を用いる方が良い。⑤判定方法については、2回の繰り返し実験の再現性吟味と、提案法での総合判定には用量反応関係を利用する方が良い。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。

以上の報告を受け、評価委員会では、更に評価を行い、酵母光成育阻害試験において陽性対照による応答の幅が広がるようなプロトコールの変更がなされれば、資生堂から提案された光毒性試験代替法バッテリーが光毒性物質を評価するのに適切な方法であるとした。現在、プロトコールの修正を待っている。この修正の適切性を判断したのち、最終報告を提出する予定である。

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評価

第1章 序

1) はじめに

代替法に関する厚生労働研究班で評価を希望する新しい動物実験代替法の募集について、資生堂が開発した光毒性試験代替法バッテリーの申請があった。これは酵母を用いる光毒性試験法(酵母光生育阻害試験)と溶血性を指標とした光毒性試験(赤血球光溶血試験)を組み合わせたものであり、申請書に示された提案施設での試験結果では感度、再現性、in vivo 結果との対応性が3T3-NR法に匹敵するとともに、3T3-NR法で不得意とする不溶性の被験物質についても評価可能であることが示されていた。そこで、本研究班では客観的な検討を行うとした。なお、本試験法については多施設によるバリデーションが実施されていなかったことから、平成15年度に評価委員会で一次評価を行い、適切な試験法となる可能性があると判断し、平成15-16年度施設間バリデーションを行った。その結果に基づき、平成16年度に評価委員会で再度評価した。

第2章 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評価委員会における一次評価(添付資料1)

1) はじめに

代替法に関する厚生労働研究班で評価を希望する新しい動物実験代替法の募集について、資生堂が開発した光毒性試験代替法バッテリーの申請があった。これは酵母を用いる光毒性試験法(酵母光生育阻害試験)と溶血性を指標とした光毒性試験(赤血球光溶血試験)を組み合わせたものであり、申請書に示された提案施設での試験結果では感度、再現性、in vivo 結果との対応性が3T3-NR法に匹敵するとともに、3T3-NR法で不得意とする不溶性の被験物質についても評価可能であることが示されていた。そこで、本研究班では客観的な検討を行うとした。

2) 方法

評価委員会は日本動物実験代替法学会の協力を得て、光毒性試験の専門家および米国の代替法評価組織である ICCVAM での評価に協力した経験を有する専門家、および統計の専門家により構築した。これらに委員会の名簿を以下に示す。

評価委員会

委員長

田中憲徳(食薬センター・秦野研究所):評価委員会委員長、in vitro 毒性専門家、光毒性専門家

委員

板垣 宏(資生堂・安全性分析センター):in vitro 毒性専門家、代替法専門家、バリデーション専門家。

今井弘一(大阪歯科大学・歯科理工学):光毒性の経験のある in vitro 毒性専門家

大野泰雄(国立衛研 薬理部):研究班長、トキシコロジスト、バリデーション専門家

大森 崇(京都大学・医学部):統計解析の専門家

岡本裕子(コーセー研究本部・品質保証センター):in vitro 毒性専門家、光毒性専門家

小島肇夫(日本メナード化粧品・総合研究所):in vitro 毒性専門家、バリデーション専門家、代替法評価の専門家

畑尾正人(資生堂・基盤研究センター):毒性専門家、代替法評価の専門家

若栗 忍(食薬センター・秦野研究所):光毒性専門家

なお、板垣 宏氏は今回の申請者の一人であり、評価の公平性に対する疑問を生じさせる可能性があることから、評価委員会の審議により今回の評価委員からはずれ、会議では情報提供のみ行うとされた。

評価資料

資生堂より提供を受けた投稿論文、生データおよび集計データに基づいて評価した。

資生堂から提供された資料は以下のとおり。

○酵母光生育阻害試験及び赤血球光溶血試験の組み合わせによる光毒性評価方法の提案

資料1-1)モルモットを用いる光毒性試験プロトコール

資料1-2)モルモットを用いる光毒性試験の再現性及び予測性など

資料2)光毒性のメカニズム、Battery system による光毒性評価フロー、酵母光生育阻害試験の原理、赤血球光溶血試験の原理

資料3-1) Battery system プロトコール

資料3-2) 酵母光生育阻害試験プロトコール

資料3-3) 赤血球光溶血性試験プロトコール

資料4)被験物質リスト(規格、特性)

資料5)被験物質の in vivo 試験結果

資料6-1)被験物質の in vitro 試験結果まとめ

資料6-2)被験物質の酵母光生育阻害試験結果のまとめ

資料6-3)被験物質の赤血球光溶血試験結果のまとめ

- 資料7-1) Battery system における感度、特異性、予測性、一致率及びその他の特徴
 資料7-2) 酵母光生育阻害試験における感度、特異性、予測性、一致率及びその他の特徴
 資料7-3) 赤血球光溶血試験における感度、特異性、予測性、一致率及びその他の特徴
 資料8) 酵母光生育阻害試験及び赤血球光溶血試験の再現性について
 資料9-1) 引用文献5: In vitro assays to predict phototoxicity of chemicals: (I) Red blood cells hemolysis assay, M. Sugiyama, H. Itagaki, T. Hariya, N. Murakami and S. Kato, AATEX 2, 183-191, 1994.
 資料9-2) 引用文献6: In vitro assays to predict phototoxicity of chemicals: (II) Yeast growth inhibition assay and battery system, , M. Sugiyama, H. Itagaki, and S. Kato, AATEX 2, 193-202, 1994.
 資料9-3) 引用文献7: Photohemolysis test and yeast growth inhibition assay to assess phototoxic potential of chemicals, M. Sugiyama, H. Itagaki, and S. Kato, "In vitro skin toxicology: Irritation, phototoxicity and sensitization", Mary Ann Liebert Inc. Publishers, New York, 1994, p213-221.
 資料9-4) 引用文献8: 光毒性試験代替法 試験の実例; その有用性と問題点、杉山真理子 AATEX 5, 268-277, 1998
 資料10) 試験実施者の経歴に関する資料
 資料11) 試薬・被験物質管理記録等の生データ
 資料12) 酵母光生育阻害試験の生データ
 資料13) 赤血球光溶血試験の生データ

秘密の保持と評価結果の公表について

審議結果は公開シンポジウムや研究報告書等で公開することを前提にしているが、個人に関する情報は公開せず、また、委員にも配布せず、事務局で保管し、必要に応じて口頭あるいは書面提示の上で説明するべきとされた。申請資料に添付された個別データは委員に配布せず、必要があれば委員にコピーを配布するとされた。また、今回の申請資料に掲載されたデータに基づいて今回の目的を越えて、利用、解析、公表する際には個別に申請者に了解を得なければならないとされた。なお、既に論文等に発表されたデータの利用は自由とされた。

3) 評価結果

評価委員会では平成15年度において4回の会議を開催し、資生堂より提供された申請資料を評価した。

3-1) 資生堂から提案された光毒性試験代替法バッテリーについて

3-1-1) 申請試験法についての申請者の説明

申請法は被験物質による寒天ゲル中での酵母の発育阻止円に対する太陽光近似光の影響と赤血球の溶血反応に対する太陽光近似光の影響とを組み合わせた方法である。この方法の特徴は以下のように要約される。

- ①被験物質の光刺激性の有無を判定するものであり、光感作性を判定するものではない。
- ②化粧品には水溶性の低い物質が多く、本法はそれらにも適用可能である。
- ③提案法で光毒性が陽性と出た物質の中には in vivo 試験で陰性となるものもあったが、false negative は無い。全体として感度、評価の一致性が高い。

3-1-2) 評価委員会での審議

評価委員会の審議結果を以下に要約する。

(1) 提案は評価に値するか？

in vitro 光毒性試験としては既に 3T3 細胞を用い neutral red 取り込みを指標とする光毒性試験法(3T3-NRU 法)が OECD の専門家会議で承認されている。提案法は 3T3-NRU 法と同等の結果が期待できる。また、3T3-NRU 法では水難溶性の薬物では評価結果のばらつきが大きくなる可能性を平成 14 年度の報告で示しているが、提案試験法は水難溶性物質にも対応できる方法である。これは水難溶性

のものが多い化粧品の評価においては重要である。更に、いずれの方法も簡便な方法であり、必ずしもクリーンベンチでの操作を必要としない。これらのことから、提案された光毒性試験バッテリーは評価委員会で評価する価値があるものと判断した。ただし、多施設バリデーションの結果が含まれていないため、評価委員会ではその妥当性に関する最終的な判断のためには、複数の施設で実施するバリデーション研究が必要であると判断した。

(2) 開発のコンセプトの妥当性

酵母光生育阻害試験は細胞膜と細胞小器官への作用に対する毒性を通じた細胞死や増殖抑制を指標とする方法である。赤血球光溶血試験は細胞膜破壊を指標とする試験である。提案されたバッテリー法は両者を組み合わせることにより、多様な作用機序に基づく光毒性を評価できるとともに、光毒性のメカニズムに関する情報を得る事ができると考えられる。なお、膜破壊は酵母でも観察されることから、酵母と赤血球での本質的な差およびバッテリーを組む必要性について論議された。その結果を以下に示す。

光毒性につながる光化学反応には、光により励起された化学物質の緩和過程により幾つかの反応がある。それらは、電子伝達に基づく機構(タイプ1)、酸素のエネルギー伝達に基づく機構(タイプ2)及びそれ以外の機構に大別される。これらの機構は水の有無や媒体の種類などの試験系により大きく変化する。水系ではタイプ2型の反応が中心と考えられる。一方、有機溶媒ではラジカル反応(タイプ1)が中心と考えられる。反応系が水系の赤血球光溶血試験や光細胞毒性試験では主にタイプ2の光毒性を捉えることが可能である。一方、酵母光生育阻害試験では種々の媒体が使用可能であり、より広範囲の化合物の光毒性をとらえることができると期待できる。

一方、単細胞生物である酵母では基本的に細胞に対する全ての影響が見られるものと想定されるが、赤血球で光毒性を検出できた物質の一部は酵母では捉えられないことがある。これは赤血球の膜構造は細胞膜のみから構成されているが、酵母では細胞膜とグルカン等の多糖類からなる細胞壁から構成されており、酵母の膜構造が赤血球より安定であることによると思われる。即ち、膜破壊作用の弱いものは捉えにくいと考えられる。また、細胞壁の存在により、被験物質あるいは光活性化体が細胞内標的部に到達せず、false negative になる可能性がある。これらのことから細胞膜に障害を与える光毒性物質の評価においては赤血球光溶血試験法の方が感度が高いと思われた。

また、酵母は有機溶媒に強く、エタノール、メタノール、アセトン、及び DMSO を直接濾紙上に滴下しても、阻止円の広がりや全く認められてない。一方、赤血球光溶血性試験では試験系において溶媒濃度が1%になるように被験物質溶液が添加されるが、DMSO では溶血が現れる場合がある。

即ち、酵母は、細胞膜破壊を伴う光毒性に関する感度は若干低いが、耐溶媒性が高いこと、細胞の生存・生育に関わる全ての過程への影響を検討できることから、広範囲の被験物質や多くの作用機序による光毒性の検出に適用できると思われた。これに対し、赤血球光溶血試験の方は、細胞膜破壊を伴う光毒性に関する感度が高く、作用機序が明確であること、弱い作用を感度良く検出できる利点があると思われた。したがって、これら二つの方法を組み合わせることにより想定される状況を全てではないが、多くをカバーできると考えられた。

(3) 3T3-NRU 法との比較

OECD が提案している 3T3-NRU 法は、液体培地と細胞を使用した方法である。この方法では、水難溶性被験物質を培地全体に分散させることが難しい。また、用いた媒体が細胞に毒性を示す場合があり、媒体の選択にも注意を要する。実際、3T3-NRU 法では水難溶性の薬物では anthracene や amiodarone、fenofibrate などの水難溶性物質では評価結果の施設によるばらつきが認められている(平成14年度厚生労働科学研究報告書)。一方、酵母光生育阻害試験は、寒天ゲルで菌を培養する方法である。この方法では、培地上に被験物質を乗せるだけで水溶性、水難溶性を問わず、被験物質が良好に拡散することが期待できる。

赤血球光溶血試験はプレートの底面に付着している 3T3-NRU 法と異なり浮遊している赤血球と反応させる方法であり、膜破壊や蛋白変性を生じない溶媒を選択できる。

以上の点から、今回提案した本試験系は、3T3-NRU 法よりも耐溶媒性並びに評価可能な被験物質の範囲の両面から優れていると考えた。

(4) 評価できる光毒性の内容

提案方法が毒性の有無を判定するのか、毒性の強さの段階付けか、あるいは定量的判定が可能かの問題に関して、酵母法および溶血法はいずれも試験結果が数値で示され、光毒性の強さについてある程度の情報を得ることができる。しかし、バッテリーでの評価の結果は光毒性の有無の判定のみである。

(5) 被験物質の適用範囲の妥当性

化粧品及び化粧品基剤を含む化粧品原料の光毒性の評価を目的にしているが、提出データによれば香料(8)、紫外線吸収剤(5)、薬剤(4)、抗生物質(4)、染料(3)についても試験が行われており、医薬品、医薬部外品なども含む化学物質一般にも応用可能と思われる。

(6) SOP について

SOP は理解しやすいか？

試験法の SOP の記載は、全くの素人でない限り理解に問題は生じないが、多施設バリデーションを実施するにはいくつか修正する必要があるとされた。その詳細は省略する。なお、SOP を一般化するには多施設バリデーション結果を踏まえ、その修正について議論する必要があると考えた。

SOP に必要な機器、器具、器材は十分に記載されているか？

必要な機器、器具、器材については十分に記載されていた。なお、光照射に際しては、試験条件を明確に規定する必要があること、光源の特性を確認することの必要性の記載、及び照射むらを少なくするために、場合によってプレートを回転させたり、移動させたりすることの必要性について記述されるべきとされた。

結果の判定方法の妥当性

酵母光生育阻害試験の判定基準が以前の論文では判定基準が2mmとなっていたが、今回の SOP では5mmとなっており、今回の判定基準を決めた根拠となるデータを示して欲しいとの指摘に対し、判定基準を2mmとした場合、false negative はなくなるが一致率が低くなるため、判定基準を変更した、また、2mm の判定基準では、静置したディスクのわずかなずれ動きが判定に影響を及ぼすことから幅を広げた、と回答された。

一方、施設内バリデーションの結果では5mmの基準値よりほんのわずかな小さい値の被験物質が多くあったことから、グレイゾーンの設置の必要性について議論され、グレイゾーンを設置することとされ、阻止帯の差が2mm以上5mmより小さい場合は疑陽性とするたとされた。

赤血球溶血試験の判定基準(5-10%)を決めた根拠については、不十分な洗浄や赤血球の状態などによっては少量の溶血がみられることもあるため、5%までは許容範囲とした。さらに in vivo 試験において、±、+と評価していることから、赤血球溶血試験においても10%までグレイゾーンを設けた判定基準とした、と回答された。

陽性の判定において、1濃度でも陽性となれば陽性と判定するのかが明確ではなかったが、1濃度でも再現性の有る陽性結果が得られれば光毒性陽性と判断するとされた。

二つの方法のうち一方しか結果が得られなかった時のバッテリー試験としての判定について検討され、一つの方法で陽性の場合には当該被験物質は光毒性陽性と判断するとされた。陰性の場合には、もう一つの方法の結果によって評価が左右されるので判定不能とするたとされた。

なお、これらの内容をバリデーションのために作成する SOP で明確にすべきとされた。

なお、濃度設定の SOP では最高溶解濃度を含む3段階と一義的に定められているが、実際にはいくつかの濃度で実験が行われていることがあった。必要性に応じて濃度設定の変更が可能ないように SOP を変更すべきとされた。

また、実際の評価において、繰り返し試験を行った場合の判定方法については、原則として2回の試験結果の平均値を採用するが、判定が大きく食い違う場合には、追加試験を行うと SOP に明記するべきとされた。

被験物質の最高濃度について

溶媒の選択基準や最高濃度の設定について曖昧であると、光毒性の判定結果に影響がでる可能性

があることから、未知の被験物質について、溶媒の選択基準と最高濃度の設定方法を統一するべきと提案者にコメントされた。

光源

光源に SOL500 を用いる場合、24 ウェルプレートや 6 ウェルプレートをすべて使用するとかなりの照射量ムラができる。むらの無い部位にプレートを置く方法と照射の途中でプレートの向きを変えるか、使用するプレート数を制限する方法が示された。

その他

赤血球光溶血試験法において、赤血球から遊離したヘモグロビンを定量する際、540nm の波長での吸光度では、ヘモグロビン変性が生じたとき溶血性を低く見積もってしまう懸念がある。そこでヘモグロビン変性による影響の少ない 525nm でも実施することが提案された。

(7) 試験は容易に実施できるか？

光照射の器械さえあれば操作は簡単と思われた。なお、赤血球の完全溶血液の調製が溶媒のエバポレーションを行うなど、用時調製だと面倒なステップが含まれている。Triton X-100 添加などの簡便な方法で対応できないのか、議論され、改善するとされた。なお、多施設バリデーションを実施する際には、経験の無い施設には技術トランスファーが必要である。

(8) 提案書に記載されたバリデーションの種類

提案者の施設内での再現性が評価されているが、公平な評価を行う上では多施設バリデーションの結果が必要である。

(9) 申請者の行ったバリデーションの結果について

被験物質の妥当性

被験物質として 24 物質(香料(8)、紫外線吸収剤(5)、薬剤(4)、抗生物質(4)、染料(3))が使用され、評価されている。この中には提案試験法の特徴を確認するために水難溶性物質も多く含まれている。また、紫外線吸収剤や香料などの化粧品原料だけでなく、薬剤や抗生物質も含まれ、それらについて in vivo と対応する結果が得られている。これらのことから、化学物質全般を対象とした試験法の評価のための被験物質として、選択はほぼ妥当と思われた。

一方、今後のバリデーションに際しては、tetracycline や ketoprofen、amiodarone、nalidixic acid、ofloxacin、fenofibrate、demecrocycline など EU/COLIPA のバリデーションで施設により false negative となった物質も採用することが望ましいとされた。

データの信頼性

提案施設は光毒性試験について長い経験があり、担当者も十分な経験を受けたものであり、技術的には問題無いと考えられる。一方、施設が GLP 認定施設ではないこと、SOP の様式が GLP に則っていない等の理由から、提出データは厳密に GLP に準拠して作成されたものとは言えない。しかし、試薬調製記録や試験結果等の生データが適正に記録・保管されており、今回の申請に際して生データの正文が提出され、データの追跡解析は可能であった。また、データの修正手続きについては通常の GLP 試験と同様に行われていた。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。

生データと個別データ、まとめた結果との対比については、多くのデータについて二次データとの同一性が確認されたが、赤血球光溶血試験のまとめたデータには被験物質毎に3回の試験結果しか示されていないが、実際にはより多くの試験が行われていたという問題点が指摘された。この理由について提案者はデータに食い違いが生じた時は実験を繰り返し、3回同じ判定結果が出た時点で終了すると決められていたと回答した。

評価委員会では試験の信頼性に影響を与えるべきものであり、また、3回同じ判定結果が出たときに終了することとは試験法 SOP にも明記されていなかった。しかし、事前に提出された個別データ中にそれら採用されなかったデータも含まれており、恣意的に隠したものは無いとされた。また、このように

すると3回の試験結果の平均をとって評価するという SOP が意味を持たなくなる。そこで、多施設バリデーションの際には正当な理由が無い限り行った試験結果全てを採用すべきであると指摘された。また、繰り返し試験の結果は平均して評価することを SOP に明確に記載するべきであるとされた。

再現性

繰り返し実験でのデータのばらつきは酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験のいずれにおいても多くの物質において極めて小さく、ある程度の経験のある者が実施すれば、施設内再現性の良い方法であると思われた。

施設間再現性については、多施設でのバリデーションが実施されていないことから、判断できなかった。

in vivo データの妥当性

適切な方法で行われたモルモットでの実験結果と比較している。しかし、その報告では評価点の平均値は与えられているが個々の値は提出されておらず、今回の実験での評価点の精度について判断できない。但し、提案者の施設で実施された 0.02% の 8-methoxypsoralen の歴史データの変動係数は 0.16-0.26 とばらつきも少なく信頼できる。また、提案試験法を評価する上でモルモットの結果と比較することの妥当性について議論され、論文等に示された動物実験データやヒトデータとの比較も必要であるとされた。

In vivo データとの対応性

動物実験結果との比較では false negative は無く、false positive は幾つか認められた。しかし、false positive とされた薬物の多くはヒトであるいは他の論文では陽性とされたものであり、バッテリーとしての光毒性物質の予測性は良いと思われる。但し、酵母法および溶血法のそれぞれ単独では false negative が出ていることに留意すべきである。なお、false negative が 0% であるという判定は陽性物質 9 検体での結果であることにも留意すべきである。

試験法の頑健性

異なる光源を用いた論文データを比較し、酵母 4 例、赤血球 2 例、結果が異なっていた。使用する溶媒、酵母の種類、羊赤血球の年齢による相違や赤血球の種による相違があるか否かについては不明である。これらの事を調べるためには更にバリデーションが必要である。

判定基準

酵母光生育阻害試験において galaxolide、chlorpromazine、anthracene のように、結果が判定基準に近いものが多くあった。これらは判定基準を少し変えるだけで、判定が変わる可能性がある。結果の判定基準は蓄積されたデータに基づいてどこかの値に決めるものではあるが、基準値に近いところに多くの物質が集まることは、判定の不確実性につながり、望ましくない。このような場合は、グレイゾーンを設置するのが良いとされた。

結果の記録方法について

結果をまとめた記録紙からは被験物質の濃度による用量依存性がどちらの試験法でも認められなかった。これはどちらの試験法も評価のエンドポイントについて、光照射の有無による差のみを求めるように規定されているためである。しかし、照射・非照射の用量反応関係は重要であるので、酵母光育成阻害試験では阻止帯を、赤血球光溶血試験では、溶血度の測定値から用量反応を確認するようにした方がよいとされた。

(10) 動物福祉面からの妥当性

酵母の方法は問題なし。赤血球光溶血試験は羊から採血した血液を用いている。動物材料を少しでも減らすと云う点から云えば、人血での代用可能性もあるが、羊は採血後に屠殺せず、同じ動物から何度も採血することができることから、動物福祉面での問題は無いと考えた。

(11) コストからの妥当性

2つの試験を行うことから材料費や手間の点で 3T3-NRU 法よりコストがかかるかも知れない。また、酵母法では 25℃と通常のインキュベーションと異なることによるコストがかかるかも知れない。

(12) その他の面からの考察

提案法を受け入れる条件として、3T3-NRU 法単独よりも今回のバッテリー試験法が優位な一致性を示す必要があるのかそれとも同等であっても他のメリットがあれば良いのかということについて、検討され、同等ならば受け入れても良いのでは無いかとされた。

(13) 総合評価

試験法の背景および提出データの結果に基づく、現時点での総合評価として、以下の様な利点があり、光毒性の有無を判断することを目的とする化学物質のスクリーニングに有用と思われた。しかし、多施設バリデーションを実施して、その結果を見て最終的な総合評価を行うべきであるとされた。

試験法の利点

- ① 実験方法に培養細胞を用いていないので試験法が比較的簡便である。
- ② 水難溶性物質に対しても適応可能である。
- ③ 化粧品や化粧品原料だけでなく、広く一般の化学物質にも使用可能である。
- ④ 特性の異なる2種の試験法の組合せによって異なる毒性機序に基づく光毒性を検出可能である。
- ⑤ 光毒性物質の予知の際に最も困る false negative は出なかった。

なお、提案された試験法で捉えられるものは光増感作用のある物質である。光感作性については、この試験法で陽性と評価された物質を光蛋白結合性等の他の試験法で評価することが必要と考える。また、3T3-NRU 法も含め、これらの試験系で陽性結果が得られた物質を産業的に利用する場合には、リスク評価を行うための試験が必要となる。

多施設バリデーションを実施する際には、他の施設が誤解することがないように SOP の詳細を検討する必要がある。また、提案された方法が適切か否かを判断する場面では、3T3-NRU 法と比較されることになることから、バリデーション研究の結果として明確な結論を導くためには、同様の条件下で 3T3-NRU 法を同時に実施することが望ましいが、参加施設への負担をも考慮し判断すべきである。

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験とのバッテリーを組む必要性については、その理論的な背景と実際のデータの両面からの疑問が十分払拭されておらず、更に検討する必要がある。

なお、多施設バリデーションの際に提案者の SOP を、評価委員会やバリデーション委員会が、提案者の了解を得ずに、勝手に変更する事は許されないことを確認した。

これらを踏まえ、日本動物実験代替法学会に今回の光毒性試験バッテリーの多施設によるバリデーションを依頼することとした。

(14) 多施設バリデーションについて

今回の評価で評価委員会としては多施設バリデーションを行う必要があること、また、その価値があると判断した。多施設バリデーションの目的は、①施設間のばらつきを評価する。これは PIF や MPE レベルでの施設間の比較では大きな差が生ずる可能性があることから、3T3-NRU 法との比較の上で評価することが重要であるとされた。しかし、作業量の関係から、3T3-NRU 法での試験を平行して行うのではなく、Dr Spielmann らのバリデーション結果と比較すべきとされた。また、②in vivo 試験結果との対応性について詳細な検討を行うためには多数の被験物質が必要であるが、それは実施困難であることから、バリデーション目的として、施設間のバラツキ評価を重視すべきとされ、被験物質の数や種類を絞ることが提案された。また、過去のデータを基にクリティカルな被験物質(明確な陽性、陰性、境界領域、ばらつきや誤評価の多かったもの等)を選択し、なるべく少数で結論が得られる事が重要であるとされた。また、比較すべき in vivo データとは動物実験結果かヒトデータかということについて議論され、ヒト試験では光感作性と光毒性とが混在している可能性があり、ヒトでの結果が明確な場合を除き、動物データと比較すべきであるとされた。③提案試験法の利点を確認する。④製品への適応性に関しては、陽性を示す製品は入手できる可能性は低いこと、クリーム等に被験物質を添加したとしても、その光毒性を同時に動物実験で確認する必要が生ずることから、困難であるとされた。

なお、多施設バリデーションは3ヶ月程度で終了できる程度の被験物質数にすべきとされた。また、可

能であるならば、ECVAM との共同バリデーションの途を探るべきとされた。