

### 第3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多施設バリ デーション(添付資料2)

#### 1) はじめに

評価委員会の一次評価結果に基づき、日本動物実験代替法学会長および厚生労働科学研究「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究(H15-リスク002)」班長である大野より、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が要請された。バリデーション委員会と評価委員会との合同協議の結果、多施設バリデーションを実施することとした。

バリデーション委員会は、以下に述べる「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。2004年4月に実験部分を終了し、データを回収後、被験物質コードを開示するとともに、データ解析をすすめ、2004年9月に最終報告書を提出した(添付資料2)。本稿はその要約である。

#### 2) バリデーション方法

##### 光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会の組織

光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会(実行委員会)の設置当初の委員は以下のとおり。委員長は学会バリデーション委員会委員長の吉村がつとめた。

(株)資生堂安全性・分析センター	板垣 宏(提案施設代表)
国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 大野泰雄(被験物質、試薬、器材担当)	大森 崇(バリデーション委員会委員、データ解析担当)
京都大学医学部	
大鵬製薬(株)	川端留美(バリデーション委員会委員)
日本メナード化粧品(株)総合研究所 小島肇夫(被験物質、関連情報担当)	
(財)食品薬品安全センター秦野研究所	田中憲穂(評価委員会委員長)
東京理科大学工学部	吉村 功(バリデーション委員会委員長)

後に、以下に示すバリデーション実験参加施設より、岡本裕子、土肥孝彰、森 眞輝、藤田百合子、穂谷昌利、若栗 忍が参画した。

##### バリデーション実験参加施設

バリデーション実験への参加施設は日本動物実験代替法学会のホームページ及びニュースレターを通じて募集した。その結果、以下の6施設が参加することとなった。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	(森眞輝、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)

##### 試験計画書及びSOPの検討

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)と協力し、多施設バリデーションを実施した。なお、評価委員会のコメントを尊重し、提案者が提案法を若干修正し、当研究班の主任研究者である大野及びバリデーション委員会の了承を得た。なお、陽性対照物質は酵母光生育阻害試験では8-methoxypsoralen(8-MOP)、赤血球光溶血試験ではacridineを用いた。SOPは以下に述べる技術移転のための講習会、及び予備試験結果に基づき、若干の修正を行った。

なお、赤血球光溶血試験で光溶血度を測定する際のマイクロプレートリーダーによる吸光度測定はヘモグロビンの吸収極大である波長540nmとヘモグロビン変性による影響の少ない525nmの2種類で実施したが、主解析は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。

### 試験の実施と結果の判定

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験のそれぞれについて同じ濃度で2回繰り返し、それらの結果が大きく異なる場合は再度実験を行い、3回目の試験結果に近い結果と合わせて当該試験での評価とした。また、バッテリーとしての総合評価は下の表に示したように、いずれの試験においても光毒性陽性と判定された被験物質は光毒性陽性、疑陽性と陰性の組み合わせの場合は疑陽性、いずれの試験でも陰性の場合に陰性と判定した。

		赤血球光溶血試験		
		陽性	疑陽性	陰性
酵母光 生育阻 害試験	陽性	陽性	陽性	陽性
	疑陽性	陽性	疑陽性	疑陽性
	陰性	陽性	疑陽性	陰性

網掛け太字の部分が総合評価

### データ解析

試験で得られたデータは京大(大森)と東京理科大(吉村)に送付され、データクリーニングの後、再現性や施設間差、光毒性の予測性等について解析した。この結果を更にバリデーション実行委員会で検討した。この結果の報告はバリデーション実行委員会報告書として評価委員会に提出され、再度評価する予定である。

### 技術移転のための講習会

実行委員会は、計画書にそって、食品薬品安全センター(秦野)で2日間の技術研修会を開催した。ここでは提案された方法について、提案者から説明を受けたのち、実験部分を担当する参加施設の者が実際の実験操作をシミュレートした。また、GLPの原則について、説明し、全ての実験操作と修正手続き、データの保管等について、GLPの原則に従うよう依頼した。

### 被験物質

動物或いはヒトでの光毒性の有無が示されており、EU/COLIPAのバリデーションで用いられた物質及び提案者の歴史データとしてモルモットでの光毒性の有無が確認されている物質(表1)の中から光毒性陽性物質を4品目(anthracene、amidarone、chlorpromazine 塩酸塩、acridine)、陰性物質5品目(chlorhexidine、bithionol、sodium lauryl sulfate (SLS)、6-methylcoumarin、4-5-butyl-4-methoxydibenzoylmethane)を選考した。なお、bithionolと6-methylcoumarinはモルモットでは陰性であったが、EU/COLIPAの報告ではヒトで陽性とされたものである。陽性対照以外の被験物質は各施設6品目ずつ配布し、それぞれの被験物質について4施設で評価できるように計画した。薬物コードと実験施設との割付表は吉村委員が作成し、被験物質のコード化と割付および配布は大野が行った。コード表は全ての施設で実験が終了し、全てのデータが解析担当者(吉村、大森)に提出されたことを確認した後に、大野が開示した。

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。

表 3-1 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
<u>Amiodarone</u>	P		P
Anthracene	P	P(1.8)	P
Bithionol	N	N(0)	P
Chlorhexidine (CHD)	N		N
Chlorpromazine (CPZ)	P	P(1.6)	P
5-Methoxypsoral en (5-MOP)	P	P(2.7)	P
Sodium lauryl sulfate (SLS)	N		
2-Ethylhexyl- <i>p</i> -d imethylaminobenz oate (EDA)	E	E(1.0)	

	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
4- <i>t</i> -Butyl-4-me thoxydibenzoyl methane (BMDM)	N	N(0)	
Musk ambrette	N	N(0.7)	N
Piroxicam	N	N(0)	N
Rose bengal	N	N(0)	E
3,3',4',5-Tetra chlorosalicylanili de (TCSA)	P	P(1.5)	
8-Methoxypsora len (8-MOP)	P	P(4.8)	P
6-Methylcouma rin (6-MC)	N	N(0)	P
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 3-2 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	○	○	○	○	×	×
chlorhexidine diacetate	C	N	○	○	○	○	×	×

chloropromadine hydrochloride	D	P	○	○	×	×	○	○
Bithionol	E	N	○	○	×	×	○	○
sodium layryl sulfate	F	N	○	○	×	×	○	○
Acridine	G	P	×	×	○	○	○	○
6-Methylcoumarin	H	N	×	×	○	○	○	○
4- <i>t</i> -Butyl-4-methoxydibenzoyl methane	I	N	×	×	○	○	○	○

P: 光毒性陽性物質、N: 光毒性陰性物質

なお、被験物質は以下の物を用いた。Anthracene (Nacarai tesque, M3K2166)、Amiodarone hydrochloride (Sigma, lot 061K1807)、chlorhexidine diacetate ((Sigma, lot 71K1909)、chloropromadine hydrochloride (Nacarai tesque, lot M2B1226)、Bithionol (Sigma, lot 042K1192)、sodium layryl sulfate (和光純薬 lot PKL0556)、Acridine (東京化成, lot. FGG01)、6-Methylcoumarin (和光純薬, lot ASG7226)、4-*t*-Butyl-4-methoxydibenzoylmethane (BMDM, Parsol 1789)。

#### 器材、試薬

実験参加施設への試薬、被験物質、及び器材の提供は国立医薬品食品衛生研究所薬理部の大野が担当した。

被験物質は約2g ずつ分包、コード化し、各施設へ送付した。試薬は光溶血性試験の陽性対照物質としてアクリジン(東京化成社 lot FGG01)を約1g、酵母光生育阻害試験の陽性対照物質としてキシントキシン(Nacarai tesque, lot. M3P5837)を約0.3g 各施設へ送付した。なお、陽性対照物質として当初配布したAldrich社のアクリジン(lot 21315PA)が原因不明の理由により光毒性を示さなかったことから、本試験では資生堂により光毒性を確認した東京化成社製のアクリジン(lot FGG01)を使用した。

光溶血試験のための培養プレートはファルコン社製の24Well及び96Wellマイクロプレートをそれぞれ30プレートずつ、酵母光生育阻害試験のための培養プレートはコーニング社製の6wellマイクロプレート90プレート、ペーパーディスク(アドバンテック、抗生物質検定用 厚手6mm) Lot 30606691 1000個入り一箱を各施設に送付した。

#### 光源

光照射のための太陽光のシミュレーション光源はEU/COLIPAのバリデーションで用いられたDr. Hönle社のSOL500を用いた。

#### バリデーション実験の遂行とデータ解析

実験参加施設は2003年中に上に述べた技術講習会に出席した後、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及び吉村に送付した。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。

#### その他

バリデーションはGLPの原則に則ってSOPに定められた通りに実施するとともに、試験結果は定められた様式に従って記録した。また、SOPに従わなかったこと、記録の修正に関しては、GLP上適切な形で修正日と修正者名及び修正理由を明記することとされた。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。生データは5年間各施設に保管するとともに、そのコピーを国立衛研に提出し、適切と判断される時期まで保管することとした。

#### 3) バリデーション結果

### 3-1) 実験データの管理と解析

#### 3-1-1) 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。

#### 3-1-2) 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。

#### 3-1-3) 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 3-3 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 3-3 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

### 3-2) 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 回ずつ別々の 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 3-4 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

### 3-3) 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 3-5 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。

表 3-5 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

この結果を *in vivo* 判定と比べると、表 3-6 および表 3-7 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 3-6 および 3-7 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 3-6 および表 3-7 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 3-6 *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 3-7 *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%)

#### 4) 考察

##### 4-1) 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 3-8 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 3-8 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)	<i>In vivo</i>
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・非照射で用量反応が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

#### 4-2) 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。提案の内次に示すものは、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。

#### 4-3) 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、酵母光育成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。

#### 4-4) *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。

#### 4-5) 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 3-9 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

#### 4-6) 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 3-10 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 3-10 *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%)

	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

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

#### 4-7) 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。

#### 4-8) 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は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。

#### 5) バリデーション結果のまとめ

##### 酵母-赤血球試験の妥当性

本研究の結果が表 3-6 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。

#### 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。

#### 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。

#### 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。

#### 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場合は慎重な判定を行うべきである。

#### 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。

## 第5章 バリデーション委員会報告を踏まえた評価委員会での評価(添付資料3, 4)

### 1) はじめにおよび方法

バリデーション委員会の報告を受けて、評価委員会では2回の会議を開催し、バリデーションの妥当性とその結果を踏まえ、資生堂から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総合的に評価した。

なお、評価にもちいた資料は以下のとおり。

- ①バリデーション委員会報告(光毒性試験代替法についての答申)
- ②評価委員会一次評価報告及びバリデーション委員報告書の図表
- ③光毒性試験代替法のためのレビューシート
- ④Total block 社の home page, Drugs Known to Cause Photoallergic, Photosensitive and Phototoxic reactions\* (Jerome Z. Litt, M.D.)  
<http://www.totalblock.com/PhotosensitiveDrugs.htm>
- ⑤酵母生育阻害試験と溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリーで使用された被験物質と試験結果のリスト
- ⑥3T3-NRU 光毒性試験で使用された被験物質と試験結果のリスト

会議では③の光毒性試験代替法のためのレビューシートを基礎に検討し、評価を行った。

### 2) 多施設バリデーションおよびその結果について

#### 2-1) 目的の妥当性について

バリデーション委員会と評価委員会の合同会議により設定された主課題は提案された試験法が施設間でどの程度変動するかを定量的に把握することであり、副次課題としてSOPや陽性・陰性の判定方法の適切性を吟味することとされていた。評価委員会ではこの目的が妥当であると確認した。また、この目的に沿って計画が立てられたと考えられた。なお、光毒物質の識別性に関する情報も得られるように被験物質が選択された。

#### 2-2) 実行組織の妥当性について

##### 光毒性試験代替法バリデーション実行委員会の構成について

13名の委員からなり、その内、3名が提案者、8名がバリデーション参加施設の者であり、実験部分に参画しない者は大野、大森、川端、および吉村の4名であった。また、光毒性試験についての経験の深いものは提案者以外にも岡本、小島、田中、若栗の4名おり、適切なバリデーションの実施が可能と思われた。また、データ解析を専門とするものは大森と吉村の2名いた。バリデーションデータの解析は実験に参加しない大森と吉村が行い、被験物質の選択とコード化、配布は実験とデータ整理に直接関与しない大野が行ったことから、データ解析と被験物質の盲検化は適切に行える組織であったと考えられた。なお、評価委員の委員との重複があったが、これはバリデーションに評価委員の意見を反映させるためであった。

##### 実験参加施設数

6施設であり、妥当と思われた。

##### 参加者の独立性

提案者がバリデーションに参加していた。これは光毒性試験を多く経験している施設の参加が少なかったことから、バリデーション参加を許容したものである。しかし、コード化されたサンプルをバリデーション実験に参加しないものが調製・コード化し、配布したこと、データ整理は実験に参加しない者が行ったことから、バリデーションの計画および実施についての問題は無いと考えている。なお、提案者は評価委員会におけるバリデーション結果の評価に参加していないことから、提案者がバリデーションに参加したことが評価結果には影響することはないと考えられる。

その他の施設については、提案施設とのつながりは無く、また、当該試験法の開発にも関与していなかったものであり、問題ない。

### 参加施設の経験等

光毒性試験に熟練していた施設は提案者とコーセー、食薬センター秦野研究所、および日本メナードであり、他の2施設の経験は少ないか、全く無かった。結果として、そのうちの1施設での結果が6被験物質中5物質に食い違いが認められ、大きくばらついたが、他はd施設で6被験物質中2物質で食い違ったのみであった。今後は参加者の経験等についてきちんと評価した上で試験実施を行うことが望ましいとされた。

### 2-3) バリデーション計画の妥当性

#### 試験法(SOP)

SOPは当初の申請段階から、計画、予備試験の段階で何度か変更された。大きな変更点は以下のとおり。

- ① 母試験の判定基準について、5mm以上を陽性、それ以下を陰性と判定するとしていたところを、2-5mmの間を擬陽性とした。
- ② 光強度計をTOPCONからDr Honle社の物へ変更した。これに伴い照射量を酵母試験では15J/cm<sup>2</sup>から8.5J/cm<sup>2</sup>へ、赤血球試験では10J/cm<sup>2</sup>から15J/cm<sup>2</sup>(2.7-2.9mWに変更した。
- ③ 光溶血試験でヘモグロビン変性の影響の少ない525nmでの測定を追加した。

これらの変更は評価委員会による事前評価において指摘された項目の追加・訂正等が主体であって、試験法の本質に関わることは無く、また、バリデーション結果の信頼性に影響を与えるものでもないことから、特に問題は無いと考える。なお、バリデーション結果から、これらの変更に関して以下のように考えられる。

- ① 溶血試験では525nmの方が感度が良かった。
- ② 今回のSOPでは暴露時間は照射強度によって変わるが、非照射で毒性のあるものでは、暴露時間により毒性が変化し、結果のバラツキにつながる。
- ③ 被験物質に細胞毒性がある場合、照射と非照射との間の差が小さくなることもあるため、用量を何点か設定し、作用性を見ておくのが良い。
- ④ Rose bengalはランプにより差が大きかった。これは可視光で活性化されることによる。

#### 被験物質数の妥当性

今回のバリデーションにおける被験物質数は9と少なかったが、今回の評価が提案試験方法の適用範囲を見るためのものでは無く、施設間のばらつきを見る事を目的としたことから、妥当と考えられた。

#### 被験物質の選択とコード化、梱包、配布方法の妥当性

被験物質はバリデーションの実験部分に直接関与しない、国立衛研が光毒性物質についての情報を集めて、選択した。

被験物質のコード化は同国立衛研が実施し、問題はないとされた。

被験物質はガラスバイアルに密封して配布した。

被験物質の配布はクール宅急便で各施設に配送した。被験物質のうちに化学的に特に不安定な物は無かった。

以上より、被験物質の選択・コード化・配布に関して問題はないとされた。

#### 選ばれた被験物質の妥当性

被験物質として Anthracene, Amiodarone, Chlorhexidine diacetate, Chlorpromazine hydrochloride, Bithionol, Sodium lauryl sulfate (SLS), Acrydine, 6-Methyl coumarine, Parsol 1789 が選択された。提案法は水に難溶性物質への適応性が高いことを特徴とするものであり、その特徴を明らかにするため、被験物質として水に溶けにくい物質が多く選択された。実際、今回の被験物質はほとんど水以外の溶媒に溶解して試験されたことから、当初の目的に合致した選択であったと思われる。但し、製品形態のものは検討されていない。即ち、提案試験法の予知性や製品レベルの物への適応可能性についての保証は今回の多施設バリデーションからは得られない。他の試験結果や文献情報に基づいた考察が必要である。

今回の被験物質の光毒性分類は動物での実験結果に基づいて行われたが、動物では陰性であるが、ヒトで陽性と、in vivoでの光毒性が定まっていなかった物を入れたことについて議論があり、それらについての文献調査を行うこととされた。また、バリデーションではもう少し判別の容易な物質を入れるべきであったとの意見もあった。また、被験物質の水溶性などの物理化学的特性やモルモットでの光毒性試験結果やヒトでの光感作性の有無をも考慮してバリデーション結果を評価すべきであるとされた。

#### その他

バリデーションの時間配分に関して、予備実験の時間を充分にとった方が良かったとの意見があった。

#### 2-4) 実施の妥当性について

##### GLP原則の遵守

試験実施前に GLP についての基本的な事項を説明したが、試験結果には多くの記載ミスや転記ミスがあった。これらはデータ整理担当者レベルで確認され、被験物質コードの開示前に修正されたこと、また、全ての生データ或いはそのコピーを事務局に提出してもらったことから、適正に処理され、データの信頼性には問題無いと考える。また、GLP 施設からのデータにはこれらのミスは少なかったことから、GLP 施設で無いところでは、試験開始前に GLP 教育をより徹底することか、あるいはバリデーション参加施設を GLP 施設のみに絞るか、または安全性試験を GLP 原則に則って実施してきた施設のみに絞ることも必要かも知れないとの意見も出た。なお、実際に GLP 施設のみにすることはバリデーション参加者がかなり減少し、受託機関のみになってしまう可能性もあり現状では困難と思われた。

##### プロトコール違反

プロトコール違反をどう扱うかについて、バリデーション委員会で審議した。その結果、単純な試験濃度ミス・測定ミスがある記載データについては、明らかなミスと判断できるデータを削除した上で採用した。

##### その他、試験実施上の問題点等

施設内のばらつきが特定の施設に大きかったことから、予備的なバリデーションを実施し、参加希望施設の技術レベルを確認することが必要であろう。

また、今回の試験法では、光源の特徴の把握等が必要であったことや、試験法の詳細についての知見が重要であったことから、SOP の精緻化の重要性と参加施設の技術レベルの確認が必要であることが示唆された。

#### 2-5) バリデーションの結果について

##### データの信頼性

技術上の問題はあったが、データクリーニングを行い、生データとの突き合わせを実施したことから、最終的なデータの信頼性は高いと思われる。

##### 施設内再現性

施設内再現性について検討した結果、b施設が特に悪く、配布された6被験物質のうち、5つの物質で、反復実験の結果が食い違った。その他にはd施設が2物質について食い違いが認められたが、その食い違いは小さかった。また、再試験を行い、食い違いが補正されていた。施設間再現性についてもb施設の結果はin vivoの結果や他の施設と食い違っているところが6被験物質中5物質と多かった(Anthracene, Amiodarone, Chlorpromazine, Bithionol, およびSodium lauryl sulfate)。b施設における食い違いの原因について、調査したところ、b施設は自身に実験に必要な一部の機器を持たず、他の施設の一角を借りて実験を行ったところから、風や光のコントロールができなかった事が判明した。また、実験担当者の光毒性試験の経験は無かった。また、他の施設と比べ、用量作用曲線のばらつきが極めて大きかった。そこで、評価委員会ではb施設を試験法のperformanceを判定するためのデータ解析の対象からはずすことが妥当であるとの結論に達した。

### 施設間再現性

光毒性試験の経験が無く、実験条件に問題があった b 施設を除けば、施設間の違いは陽性と擬陽性あるいは擬陽性と陰性の範囲に収まっていたことから、再現性に大きな問題は無いとされた。

### in vivo データとの対応性

得られた結果について、擬陽性を陽性と判定し、試験法バッテリーの performance を検討すると、光毒性試験の経験が少なく実験施設の不十分であった施設を除いて計算した時の感度は 100%、特異性は 47%、一致率は 70%となった。また、false positive (chlorhexidine, bithionol, 6-methylcoumarin)は多くなるが、false negative は無くなると指摘された。In vivo データの採用に際し、提案者はヒトでの報告例の内には不明確なものもあることから、動物実験結果を基に被験物質の光毒性の有無を判断・評価しており、提案者から提出された施設内バリデーションの結果もほぼ同様であった。一方、false positive となったものの多くはヒトでの報告例を採用している EU/COLIPA のバリデーションで陽性とされたものや (bithionol, 6-methylcoumarin)、ヒトや動物で光感作性を示すものであった。これらの結果を基に今回の評価結果が、既存の in vivo データを予測する上で十分な成績であると言えるかについて、検討したが、提案者のデータも合わせて、再度検討すべきとされた。

今回用いた被験物質の内、false positive となったが、EC/Colipa の報告では in vivo で陰性と見なされている chlorhexidine について、文献的に調査した結果、陽性との報告があった(水野、昭和52年度日本皮膚科学会要旨集)。Rosenberg らの報告 (Surg Gynecol Obstet. 143, 789-92. 1976) では chlorhexidine の光毒性は extremely low potential と記載されていた。また、Total block 社の home page には chlorhexidine が photosensitive drug として、記載されている。また、6-methylcoumarin と bithionol では提案者によるモルモットの結果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とされた。これら2物質がもともと陽性物質であるとして計算すると、特異性と感度はそれぞれ感度 91.7%、特異性 58.3%、陽性予測率 81.5%、陰性予測率 77.8%、一致率 80.6%であったが、結果のバラツキが大きかった B 施設を除くと、それぞれ 95%、70.0%、86.4%、87.5%、及び 86.7%であった。即ち、光毒性試験の経験が少なく実験施設の不十分であった施設を除き、被験物質の光毒性の有無は臨床報告とかなり良い相関があると思われた。

### 試験法の頑健性

一般に、溶媒選択の評価結果への影響は少ないと思われるが、DMSO のように、溶媒自身がラジカル消去作用を持つ場合は結果に影響する場合がある。

光源による差については今回の結果からは確認できないが、以下のような問題点が挙げられた。

- ①太陽光シミュレータである SOL500 は熱線を含むことから、プレートの下に発泡スチロール等を置くと熱がこもって、細胞が死滅することがある。UVA のランプを使用すれば、そのようなことは無い。3T3-NRU 光毒性試験法でも同様の結果が得られている。なお、照射量は UVA 量で示されることから、SOL500 の場合は同じエネルギー量でも可視光部分の光による温度上昇が問題となる可能性があることに留意しなければならない。
- ②光強度計により、測定値が変わってくるので、予め陽性対照を用いて、照射量を確認しておく必要がある。また、弱い光だと光毒性が検出できない場合がある。
- ③今回の SOP では暴露時間は光照射強度によって変わるが、非照射で毒性のあるものでは、暴露時間により毒性が変化し、これが結果のバラツキにつながると考えられる。
- ④今までの知見から、Rose bengal ではランプにより差が大きかった。これは可視光で活性化されることによる。したがって、対象とする物質の吸収波長から光源を選択する必要がある。

即ち、光源については、必ずしも頑健性が高いとは言えない。なお、照射むらがあったが、照射期間中にプレートへの全照射量が一樣になるように移動させたことから、今回については問題ないとされた。なお、溶血試験についての資生堂の提出データの解析では、使用するランプにより溶血の程度が変化していたが、判定への影響は少なかった。

一方、酵母試験では被験物質溶液の濾紙からの拡散速度の相違がバラツキの原因となる。

### 陽性対照および陰性対照物質について

酵母光生育阻害試験において、陽性対照でも阻止円が陽性判定基準の 5mm ぎりぎりのことが多かった。光を強くするなり、cut off 値を変更するなりの対応をとる必要があると指摘された。

また、阻止円が 5mm 以上にならなかった理由について、提案者の施設内データでもそうであったのか、比較・検討する必要がある。また、陽性物質である 8-MOP の阻止円が常に 10mm 位になるように条件設定をする必要がある

試験系の妥当性や実験操作の妥当性を確認するためにも、陽性対照及び陰性対照を用い、その結果が一定の範囲にある場合のみデータを採用する事が良い。

#### 酵母光生育阻害試験における Cut off value の妥当性

酵母試験において、陽性対照であるアクリジンが陽性となった施設が 1 施設のみで、他の 3 施設では擬陽性との結果が得られた。陽性対照物質による阻止円の広がりやカットオフ値ぎりぎり、あるいはそれを下回るというのは試験法として問題である。阻止円がもっと広がり、試験系の dynamic range がもっと広がるような条件を設定することが重要である。試験条件を検討し、陽性対照が明確な陽性を示すような条件を設定すべきとされた。

提案施設による酵母試験のデータでは陽性対照では 10mm 程度にはなっていたが、今回のバリデーションでは dynamic range が 5-7mm と小さかった。このダイナミックレンジの狭さではカットオフ値による誤差が大きくなってしまいうので、プロトコール中に陽性対照が常に 10mm 程度になるような条件で実験を行うことを記載する。また、そのためにはどんなパラメーターを動かせば調整ができるかを資生堂に提示してもらおうとされた。

#### 溶血性試験における測定波長の妥当性

溶血性試験においては、通常、ヘモグロビンの吸収極大波長である 540nm を用いて溶血の程度を測定するが、被験物質によっては、ヘモグロビン変性作用により、吸収波長の変化を来し、540nm での吸収が低下し、結果として溶血が少なくなったように判定されてしまう場合がある。そこで、試験によっては、変性の影響の少ない 525nm を用いて、検討されることがある。そこで、今回のバリデーションにおいても、この両方の波長を用いて溶血性を検討した。その結果、525nm の方が良い結果が得られた。

#### 3T3-NRU 法との比較

##### (1) バラツキについて

3T3-NRU 光毒性試験法と比較した結果、*n vivo* で陽性であった Amiodarone (塩酸塩の水溶性 0.7mg/mL) では今回のバッテリー法では 2 施設が陽性で 1 施設が擬陽性であったのに対し、3T3-NRU 法の PIF (光照射により用量作用曲線が何倍平行移動したかの指標) では 6/9, MPE 法 (光照射によりどれだけ毒性が強まったかを用量作用曲線全体から計算した指標) では 8/9 で光毒性陽性を示し、両者の指標で強い方の評価を採用した場合の総合評価では 1/9 が誤評価となった。Anthracene (水不溶性) ではバッテリー法では 2 施設が陽性で 1 施設が擬陽性であったのに対し、3T3-NRU 法の PIF では 7/8, MPE では 6/8 で陽性とされ、総合評価での誤評価は 1/9 であった。一方、*in vivo* で陰性であった Chlorohexidine は今回のバッテリー法では 3 施設とも陽性であったのが、3T3-NRU 法の陽性率は PIF 法では 3/9, MPE 法では 0/9 であり、総合評価では 3/9 で誤評価であった。また、動物実験で陰性、EU/COLIPA の評価で陽性とされた 6-Methylcoumarine は今回のバッテリーでは 3 施設が擬陽性、1 施設が陰性であったが、3T3-NRU 法では陽性であった。

この様に、全体としてばらつきはバッテリー法の方が若干大きいとの印象があるが、擬陽性を陽性と判断すれば、総合評価におけるばらつきは極めてわずかとなる。また、先に述べたように、Chlorohexidine が陽性との報告もある。また、酵母試験の長所である非水溶性物質の評価が可能という点については、これまでの結果からでは十分に評価できないことから、追加検討が必要とされた。

##### (2) *in vivo* 結果との対応性について

光毒性の有無の判定においては、施設毎の判定結果で検討した結果、バッテリー法では感度 62.5% (擬陽性を陽性と判定すると 93.8%), 特異性 40.0%, 陽性予測率 52.6% (55.6%), 陰性予測率 88.9%, 一致率 50.0% (63.9%) であったが、陽性対照物質の結果のバラツキが大きかった B 施設を除くと、それぞれ 76.9% (100%), 47.1%, 62.5% (59.1%), 100.0%, 及び 60.0% (70.0%) であった。また、ヒトで陽性とされている Bithinol と 6-Methylcoumarin を陽性として計算すると、感度 58.3% (91.7%), 特異性 58.3%, 陽性予測率



73.7% (81.5%), 陰性予測率 77.8%, 一致率 58.3% (80.6%)であったが、結果のバラツキが大きかった B 施設を除くと、それぞれ 65.0% (95%), 70.0%, 81.25% (86.4%), 87.5%, 及び 66.7% (86.7%)であった。

一方、3T3-NRU 法では感度 94.1%, 特異性 89.4%, 陽性予測率 83.5%, 陰性予測率 91.1%であり、Bithionol や 6-Methylcoumarin を陽性にし、ばらつきの大きかった B 施設を除いても、特異性や陽性予測率や陰性予測率の点で 3T3-NRU 法の方が若干優れていた。

#### バッテリー評価の優位性

酵母光生育阻害試験単独の結果から、バッテリー評価において、判定が変更された試験数は、36 実験中 14 であったことから、両者の組み合わせの優位性が示された。

#### その他

本法は動物実験より高感度であり、所要時間が短いという利点をもつ。

#### 3) まとめ

##### 施設内・施設間再現性

実験条件に問題があった b 施設を除けば、施設内での再現性は良かった。また、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。適切な設備を備えた施設で訓練を受けた者が行えば再現性は悪くないとされた。

##### 酵母-赤血球試験の妥当性

本研究の結果は、1 施設を除き、擬陽性を陽性と判定した場合、感度が 100%, 特異度が 47%となる。擬陽性を陽性とすれば、陽性物質を誤って陰性と判定しないという意味で、酵母-赤血球試験の有用性が示されたことになる。

##### 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問題は認められなかったが、酵母試験の dynamic range が陽性対照で常に 10mm 位の値を示す条件を資生堂に確立してもらう必要がある。その上で、カットオフ値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と思われる。

##### 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。

##### 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。

##### In vivo 光毒性との対応性

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。

##### 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。

#### 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  
陽性との報告もある。

④Rose Bengal の様に可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。

#### 添付資料

- 1) 日本動物実験代替法学会評価委員会 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報告
- 2) 日本動物実験代替法学会バリデーション委員会 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多施設バリデーション報告
- 3) 評価委員会議事録(2004.10.8)
- 4) 評価委員会議事録(2005.1.24)



ダイセル化学工業（株）より提案のあった  
皮膚感作性試験代替法 (LLNA-DA 法) の一次評価報告書

日本動物実験代替法学会 評価委員会

委員長

田中憲穂（食品薬品安全センター 秦野研究所）

大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター 薬理部）

評価委員

五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所・療品部）

高木弘毅（アベンティス ファーマ株式会社 研究開発部門  
医薬開発本部 統計解析・データマネジメント部 統計  
解析室）

筒井尚久（三菱ウェルファーマ 研究本部 安全性研究所）

手島玲子（国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部）

萩野滋延（(株) 資生堂、安全性・分析センター 代替法開  
発プロジェクト室）

牧 栄二（ヤンセン協和（株）研究開発本部データ管理部）

オブザーバー

笛木 修（(独) 医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部）