

- (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 (00%)	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)	<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きい ・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	<b>P</b>	P
	b	E	E	E		b	N	N	N		b	N	<b>P</b>	P
	c	E	N	E		c	P	(N)	P		c	N	<b>P</b>	P
	d	E	<b>P</b>	P		d	E	N	E		d	N	<b>P</b>	P
D	a	P	(P)	P	E	a	P	(P)	P	F	a	N	N	N
	b	N	<b>E</b>	E		b	E	<b>P</b>	P		b	N	<b>P</b>	P
	e	E	N	E		e	E	<b>P</b>	P		e	N	N	N
	f	N	<b>P</b>	P		f	E	<b>P</b>	P		f	N	N	N
E	c	P	(P)	P	H	c	N	N	N	I	c	N	N	N
	d	E	<b>P</b>	P		d	E	N	E		d	N	N	N
	e	E	<b>P</b>	P		e	E	N	E		e	N	N	N
	f	E	<b>P</b>	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う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に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。

## 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。

### 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。

別添え資料

1. 合同委員会議事録
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)

## 光毒性試験代替法補完実験計画書

2006年7月4日 作成者 吉村 功

2006年7月14日 改訂責任者 吉村 功

## 0. まえおき

本研究は、日本動物実験代替法学会（本学会）バリデーション委員会が、実行委員会を組織して行うものである。研究遂行中に計画を変更したときは、その度ごとに改訂日、改訂内容、改訂責任者を記録する。

## 1. 研究目的

2003年から2004年にかけて行われた酵母光生育阻害試験（酵母試験）と赤血球光溶血性試験（溶血試験）の組み合わせ（試験バッテリー）の多施設バリデーション研究（前実験）において、酵母試験のSOPの不備が指摘された。試験バッテリーの提案者は、2006年5月にSOPの改訂を行った。その改訂の妥当性を検証するための実験（補完実験）を行い、改訂後の試験バッテリーの適用における施設間差を評価することが本研究の目的である。

## 2. 実行組織

補完実験を行う組織の正式名称を「酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会」として、略称を「補完実験実行委」とする。

メンバーは次の11人で、その連絡先は添付資料1の通りである。

## 1) 実験参加施設代表：

板垣宏（資生堂）、岡本裕子（コーセー）、長谷川靖司（メナード）、田中憲穂（食薬センター）、土肥孝彰（マルホ）

## 2) バリデーション委員会委員

大森崇（京都大）、吉村功（理科大、本実行委の委員長）

## 3) 技術担当：

穂谷昌利、石川牧恵（資生堂）、小島肇（国立衛研）、石川公平（理科大）

## 3. 研究日程

2006年7月4日に、第1回補完実験実行委員会を開催し、参加施設、実行委員、実験担当者、実行委員長を確定し、改定SOPと補完実験計画書を確認した。

7月14日までに、試料と校正した強度計を各施設に配送する。

9月16日までに各施設が実験を行う。実験担当者は実験終了後可及的速やかに、データを大森、石川公平、吉村に送付し、GLP準拠の関連資料のコピーを大森に送付する。

10月中旬に中間報告会を開催する。



12月未までに報告書をまとめる

#### 4. 実験参加施設

実験参加施設は次の5施設である。

(株)コーセー研究本部品質保証センター（実験担当者：今井教安）

(株)資生堂品質保証センター（実験担当者：石川牧恵）

（財）食品薬品安全センター秦野研究所（実験担当者：若栗忍）

日本メナード化粧品（株）総合研究所（実験担当者：松永康明）

マルホ（株）京都R&Dセンター（実験担当者：米澤理一郎）

#### 5. 被験物質

各施設で実験する被験物質は前実験と同じであるが、薬物コードは異なったものとする。配布は小島（国立衛研）が行う。実験担当者は被験物質の使用、保管、廃棄すべての段階において、それらを劇物として取り扱い、必要な記録を保管しなければならない。

#### 6. 機器、消耗品と被験物質試料の準備

光源は、Dr. Hönle社のSOL500とする。強度計は小島が校正する。

資生堂（神奈川）自社の光源

食薬研（神奈川）自社の光源

マルホ（京都）自社の光源

コーセー（東京）研究班の光源1

メナード（名古屋）研究班の光源2

マイクロプレート、ペーパーディスク、酵母の手配は、共通消耗品は小島が配布する。

測定機器、実験条件で必要と思われることは各実験施設で記録を保管し、解析の際に問い合わせがあったら報告する。

#### 7. 経費

本学会バリデーション委員会委員以外の旅費は実験参加施設等の自弁とする。

補完実験実行委が送付するもの以外の実験上の消耗品は各施設で自弁とする。

#### 8. データの管理と解析

実験を行ったらできるだけ早く、結果を指定データシートに記入して、電子ファイルをメールで大森、石川公平、吉村に送付する。各種記録用紙（GLP準拠関連資料も含む）のコピーは「〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町 京都大学大学院医学研究科医療統計 大森崇助教授」に送付する。

報告されたデータは石川公平が点検し、疑問点を施設に確認し、必要な修正を行ったところでデータベースに固定する。

## 9. 検討会

一応のデータ解析ができた段階で、実行委員と実験担当者全員の参加の下で、固定されたデータの確認と解析結果の検討を行うための会合を開く。

## 10. 結果の公表

2006年12月末までに結果を厚生労働科学研究班の報告にする。

全体の結果は、厚生科学研究班報告書、学会報告、学術論文として公表する。公表の際の著者名については、検討会で確定する。

## 11. 各種問い合わせ先

実験内容についての疑問は、石川牧恵に問い合わせること。

被験物質、試料、共通消耗品についての疑問は、小島に問い合わせること。

データシートについての疑問は、石川公平に問い合わせること。

報告書、データの送付、研究の遂行についての疑問は、吉村に問い合わせること。

以上

## 改訂内容（敬称略）

### 2006年7月14日の改訂

ワープロミス・文章ミスの修正以外の、本質的な改訂部分と改訂理由は次の通りである。

1. 所属・氏名等：石川牧恵，小島肇等から，誤りの修正要求があったので改訂した。  
（添付資料の名簿部分にも改訂が及んでいる。）
2. 本実行委の委員長：2-2)において，「委員長」と書かれていたところを「本実行委の委員長」とした。委員長が誰であるか明記しておいた方がよい，という注意を受けたためである。
3. 書類送付先：「8 データの管理と解析」における，書類送付先を，電子媒体の場合は，大森，石川公平，吉村の3人とし，各種記録（GLP 準拠関連資料も含む）のコピーの場合は大森にした。コピー送付は手間のかかる作業なので，1カ所にした方が良く，その場合の宛先としては，データ解析の担当者の大森が最も適当だからである。

# 光毒性試験代替法バリデーション研究 補完実験報告書

2006年12月28日

酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会  
委員長 吉村 功

## 1. はじめに

日本動物実験代替法学会（以下「本学会」）バリデーション委員会（以下「バリデーション委員会」）は、本学会会長より、2006年6月16日に「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」）のための酵母光生育阻害試験（以下「酵母試験」）について、改訂SOPの妥当性検証のためのバリデーション研究を行うことを依頼された（資料(2)参照）。

これは2004年に報告された酵母光-赤血球試験のバリデーション研究（以下「前研究」）の結果に対して、本学会評価委員会（以下「評価委員会」）がSOPに不備があることを指摘してその改訂を求め、結果として2006年6月にその改訂が行われたためである。

バリデーション委員会は、依頼に応じるため、「酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会」（以下、「実行委」、資料(7)参照）を組織し、研究（以下「本研究」）を委託した。実行委員は、板垣宏、石川牧恵、石川公平、大森崇、岡本裕子、川端留美、小島肇、田中憲穂、土肥孝彰、長谷川靖、穂谷昌利、吉村功（委員長）の12人である。

実行委は、「光毒性試験代替法補完実験計画書」（以下「計画書」、資料(6)参照）に基づいて2006年7月4日の打合会を出発点として、石川牧恵、今井教安、米澤理一郎、松永康明、若栗忍の6人を実験担当者として、組織的な研究を開始した。

実行委は、計画書にそって、強度計の校正、被験物質の選択、試料・機材の配布を行い、実験担当者は改訂SOPに従って、予備実験と本実験を9月末までに行った。データ解析担当者は、実験担当者から送られたデータを吟味・確認した上で解析を行い、データ解析報告書 ver1.1 を作成した。実行委は、2006年10月30日に中間報告会を開催して内容を検討し、データ解析報告書とSOPの改訂について意見をまとめた。

本報告書は、中間報告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

本研究の目的は、今回のSOP改訂が、酵母-赤血球試験における施設内変動、施設間変動を縮小するという側面、in vivo の結果の予測という側面で有用であるかを、実験を通して吟味することである。

## 3. 研究の遂行

研究は概ね計画書にそって遂行された。

### 3-1) 実験の方針

酵母-赤血球試験は2つの試験を併せて光毒性を評価する試験であるから、本来なら補完実験も前研究と同様な規模で行うべきであった。しかしながら(1) 今回の改訂は酵母試験に限定されていた、(2) 前回の規模で実験を行うことは実験施設の負担が大きすぎて実行不可能であった、という2つの理由から、実行委は、本研究での実験を酵母試験のみで行うことにした。そのため、実験参加施設、被験物質共に前研究の赤血球光溶血試験（以下「赤血球試験」）のデータが存在するものに限定せざるを得なかった。すなわち、赤血球試験に関しては前研究のデータを用いることとなった。

### 3-2) 実験施設

実験を行った施設は、前研究に参加した 6 施設のうち、前実験の施設代表委員が当該施設を退職した 1 施設を除く、以下の 5 施設である。（括弧内は実験担当者）

(株)コーセー研究本部品質保証センター（今井教安）  
 (株)資生堂安全性・分析センター（石川牧恵）  
 (財)食品薬品安全センター秦野研究所（若栗忍）  
 日本メナード化粧品（株）総合研究所（松永康明）  
 マルホ（株）京都 R&D センター（米澤理一郎）

### 3-3) 被験物質とその割り当て

実験の方針上の制約から、被験物質とその割り当ては前研究と同じものであり、その内容は表 1 の通りである。試料送付におけるコードは、予測可能性を小さくするように前研究と異なるものとした。

表 1 各施設で実験を行った物質（○印）

被験物質名	コード	in vivo 判定	施設コード				
			a	c	D	e	f
アントラセン	A	P	○	○	○	×	×
アミオダロン	B	P	○	○	○	×	×
クロルヘキシジン	C	N	○	○	○	×	×
クロルプロマジン	D	P	○	×	×	○	○
ピチオノール	E	N	○	×	×	○	○
S L S	F	N	○	×	×	○	○
アクリジン	G	P	×	○	○	○	○
6-メチルクマリン	H	N	×	○	○	○	○
Parsol 1789	I	N	×	○	○	○	○

### 3-4) 光源と強度計の校正

太陽光のシミュレーション光源はすべての施設で Dr. Hönle 社の SOL500 にした。光の強度計の校正を 2006 年 7 月 10 日に行ったところ、標準としている強度計と大きく異なった値を示すものが 2 台あったので、この 2 台の施設には、標準としている強度計を送って自施設の実験の際に再度校正を行って換算係数を定め、実験を行うこととした。その換算係数はデータとして報告されている。

### 3-5) 吸光度の測定波長と実験条件の記録

前研究と全く同じとした。（資料(9)参照）

## 4. 結果の要約

実験で得られたデータは、計画書に従ってデータ解析担当者に送られ、解析された。

その詳細は「データ解析報告書 ver1.2」（資料(5)参照）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、細部を確かめたいときはこれを参照していただきたい。

### 4-1) 施設内再現性

本研究では、施設内データ量が少ななので施設内再現性を評価するのが困難である。その難点を緩和するために、酵母-赤血球試験としては平均値を用いるべき繰り返しの測定値を、個別の測

定値として扱って施設内再現性の評価に利用した。また、酵母-赤血球試験では使わないことになっている測定値も施設内再現性の評価に用いた。そのデータは表2の通りである。

この特殊な取り扱いによる判定での（陽性、擬陽性、陰性）を平均値での判定によるものと区別するために、この報告では、前者を（+、+/-、-）と表記し、後者を（P、G、N）と表記することにした。

この表記を用いると、陽性対照については2回の判定がすべての施設で(++)であり、9被験物質については表3の場合に施設内で判定の違いが生じていた。この結果は前研究より施設内再現性の良いものであるから、SOPの改訂によって施設内再現性は改善されたと考えられる。

改訂SOPでの酵母試験の用量反応曲線は、ほとんどの施設で1回目と2回目と同じ傾向であったが、そうでない施設も散見された。SOP改訂によっても施設内ばらつきは多少残っていると考えられる。

表2 施設内再現性評価に利用したデータ

	被験物質コード	試験法	実験回数	施設内再現性	施設間再現性	理由	
施設コード	e	D	酵母	1	○	×	・用量の設定を間違えて、後に追加の2試験が提出されているため施設間再現性の評価から除外。
		D	酵母	2	○	×	
	f	F	酵母	2	○	×	・予備試験および本試験1回目の結果とあわず光毒性陽性となったが、原因は不明。やり直しのため、3回目を実施。よって2回目の結果は施設間再現性の評価からは除外。
	a	D	赤血球	1	○	×	・用量の設定を間違えて、後に追加の2試験が提出されているため施設間再現性の評価から除外。
		D	赤血球	2	○	×	
	c	H	赤血球	4	○	×	・計画書には4回目を実施するようには記載されていない。
	e	D	赤血球	1	○	×	・1回目はその施設で購入した陽性対照物質を用いて実験が実施されており、後に2試験を実施しているため施設間再現性の評価からは除外。(実質的には指標の計算に陽性対照は使われていない)
		E	赤血球	1	○	×	
		F	赤血球	1	○	×	
		G	赤血球	1	○	×	
H		赤血球	1	○	×		
I	赤血球	1	○	×			

表3 施設内で異なる結果が出た場合

	被験物質	可能性	
施設	c	H	+/- or +
	d	B	+/- or +
	f	F	+/- or +

#### 4-2) 施設間再現性および *in vivo* 判定との類似性

表4は施設間再現性の検討結果を要約したものである。採用している指標は次の通りである。

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： *In vivo* 判定と判定が一致した割合

注：感度Iと感度IIの値が同じだったので、特異度については両者を区別しなかった。

表 4 施設間再現性 (P:陽性, E:擬陽性, N:陰性)

被験物質	コード	In vivo 判定	施設				
			A	c	d	e	F
アントラセン	A	P	P	P	P		
アミオダロン	B	P	P	P	P		
クロルヘキシジン	C	N	P	P	P		
クロルプロマジン	D	P	P			P	P
ピチオノール	E	N	P			P	P
SLS	F	N	N			N	G
アクリジン	G	P		P	P	P	P
6-メチルクマリン	H	N		G	N	P	P
Parsol 1789	I	N		N	N	N	N

表 5 In vivo 判定に対する実験判定の類似性 (540nm)

	施設コード					平均
	a	c	d	e	f	
感度 I	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	103/13 (100%)
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%)	1/3 (33%)	2/3 (67%)	2/4 (50%)	1/4 (25%)	8/17 (42%)
一致度	4/6 (67%)	4/6 (67%)	5/6 (83%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	18/30 (60%)

すべての施設 (3 または 4 施設) で判定が陽性となった陰性物質は 1 物質 (物質 C, クロルヘキシジン) のみで, 前研究の 2 物質と比較して減少した。物質 C は, 本研究で実施された酵母光生育阻害試験でも用量反応関係がほぼ見られなかったため, 陽性判定は赤血球光溶血試験のためである。

## 5. 考察

### 5-1) SOP 改訂の陽性対照に関する影響

SOP 改訂は, 陽性対照を確実に陽性対照と判定することに焦点を合わせて行われた。その結果, すべての施設で陽性対照が陽性判定となった。改訂の妥当性が確認できたと考えられる。しかしこのことは, 阻止帯の長さをより長い方に伸ばすことになったため, 阻止帯の差のばらつきを大きくする傾向を生み出し, 結果として施設間で大きなばらつきを生じさせたと考えられる。

### 5-2) 被験物質による SOP 改訂の影響の違い

物質 A (アントラセン) や物質 B (アミオダロン) などの陽性物質では施設間差がみられたが, 陰性と判定された物質には, 大きな施設間差がみられなかった。SOP 改訂が, 陽性判定をより明確に出そうとしたものであったため, 阻止帯の差のばらつきを大きくしたと考えられる。

### 5-3) 阻止円の測り方

中間報告会の討論において, 実験担当者から阻止円の測り方について疑問が出た。プレートの底まで円が貫通しているものと表面だけに円が見られるものがあったためである。報告会の後で試験法の提案者で検討を行ってもらい, 表面だけでもよいという結論が提出された。その結果として, SOP の該当部分に測定法の改訂が行われた。(資料(8)4.18 参照)

### 5-4) 酵母試験での施設間差

物質 E (ピチオノール), 物質 F (SLS), 物質 H (6-メチルクマリン) は施設によって酵母試験の判定が異なったが, 阻止帯の差の値に極端に大きな違いはなかった。改訂 SOP の下でも, 酵

母試験は、これら3物質で得られた程度の施設間差がある試験法と考えられる。

## 6. まとめ

最後に、補完実験の研究で得られた結果をまとめておく。

6-1) SOP改訂により、陽性対照の判定はすべての施設で陽性判定となった。この面ではSOP改訂の妥当性であったと考えられる。

6-2) バッテリーシステムでの判定は、感度Ⅰ、感度Ⅱともに100%であった。SOP改訂によって、前研究では擬陽性領域にあった物質に陽性判定が下されたためである。それにもかかわらず特異度も改善されたから、SOP改訂は有用であったと考えられる。

6-3) 陽性物質の阻止帯の差の施設間差はやや大きくなった。SOP改訂の一つの結果と考えられる。

6-4) すべての施設(3または4施設)で、バッテリーシステムでの判定とIn vivoの結果が一致したのは9物質中4物質で、前研究の2物質より多かった。これもSOP改訂の結果である。

6-5) すべての施設(3または4施設)で判定が陽性となった陰性物質は1物質(物質C、クロルヘキシジン)のみで、前研究の2物質と比較して減少した。これもSOP改訂の結果である。



酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験とを組み合わせた光毒性評価バッテリーシステム

原案作成者及びその日：大野泰雄 平成 15 年 11 月 23 日

承認者と承認日：大野泰雄 平成 15 年 11 月 25 日

## 1 適用範囲

化粧品、医薬部外品に用いられる基剤、薬剤、色剤、香料などのうち、紫外部吸収 (280~400nm) が認められるものに適用する。

## 2. 試験の進め方

以下の手順に従い、「酵母光生育阻害試験」および「赤血球光溶血試験」を行う。

### 1) 酵母光生育阻害試験 (SOP 番号 P-2)

- 1-1) 酵母光生育阻害試験の実施は SOP P-2 に従う。
- 1-2) 同一被験物質について同一濃度での本試験を 2 回繰り返す、結果として得られた阻止帯の差を被験物質の濃度毎に平均し、評価基準に従って評価する。
- 1-3) 一濃度でも陽性と評価された場合には、被験物質は光毒性陽性と評価する。
- 1-4) 陽性とは評価されなかったが、一濃度でも擬陽性と評価された場合には擬陽性と評価する。
- 1-5) 全ての濃度で陰性と判定された場合には陰性と判定する。

### 2) 赤血球光溶血試験 (SOP 番号 P-3)

- 2-1) 赤血球光溶血試験の実施は SOP P-3 に従う。
- 2-2) 一被験物質について、同一濃度での試験を 2 回繰り返す、その結果を平均し、評価基準に従って評価する。
- 2-3) 一濃度でも陽性と評価された場合には、被験物質は光毒性陽性と評価する。
- 2-4) 陽性とは評価されなかったが、一濃度でも擬陽性と判定された場合には擬陽性と評価する。
- 2-5) 全ての濃度で陰性と判定された場合は陰性と判定する。

### 3) 総合評価

酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験での評価を基に、以下の表に従って被験物質の光毒性を評価する。

酵母試験/ 溶血性試験	陽性 (+)	擬陽性 (±)	陰性 (-)
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

注：それぞれの試験の繰り返し試験の結果が大きく異なる場合は、さらに一回の試験を追加し、その結果と近い結果が得られた結果とを平均し、評価する。なお、この場合においても、かけ離れた値を出した結果も記録に残す。

#### 4) 試験法の改定

試験法の改定が必要が生じた場合は、バリデーション委員会で検討し、その結果を提案者に示し、承認を受ける。

## 酵母光生育阻害試験プロトコール

原案作成者及びその日：森 眞輝 平成 15 年 11 月 21 日

承認者と承認日：大野泰雄 平成 15 年 11 月 25 日

### 1. 目的

本試験法は、酵母を用いて被験物質の光生育阻害性を評価することを目的とする。本試験法は、光毒性試験の代替法として使用可能である。

### 2. 原理

光毒性の発現メカニズムは、化学物質が太陽光により励起され、基底状態に戻るときに放出されるエネルギーにより生じる活性酸素やフリーラジカルの生体への作用や、さらには光励起された化学物質自身の生体への作用と考えられている。この作用の生体側標的組織として細胞膜や核を含めた細胞内小器官が考えられる。本法は、光毒性試験代替法としては、細胞膜破壊および細胞内小器官に対する傷害に基づく光毒性を検出する方法である。

### 3. 適用範囲

化粧品、医薬部外品に用いられる基剤、薬剤、色剤および香料などのうち、紫外部吸収（280～400nm）が認められるものに適用する。

### 4. 材料および実験方法

#### 4.1. 試験項目およびプレート枚数

至適濃度を決定するために行う予備試験を 1 回、至適濃度付近において行う本試験を 2 回実施する。いずれの試験とも duplicate で行う。1 回の実験で 6 穴マルチウェルプレート 4 枚（照射プレート 2 枚、非照射プレート 2 枚）用いるため、1 被験物質あたり少なくとも 6 穴マルチウェルプレート 12 枚を必要とする。

#### 4.2. 対照物質

#### 4.2.1. 陰性対照物質

被験物質溶液の調製に用いた溶媒を陰性対照物質とする。

#### 4.2.2. 陽性対照物質

キサントトキシシン (8-methoxypsoralen, ナカライテスク (株)) を用いる。

#### 4.3. 器具類

##### 4.3.1. 6穴マルチウェルプレート

CORNING 社製 No. 25810, COSTAR 社製 No. 3516, FALCON 社製 No. 3846 のいずれかを用いる。  
同一試験内では製造メーカーおよびロットは同じものを用いる。

##### 4.3.2. ガラス器具

三角フラスコ, メスフラスコ, メスシリンダー, びん, スピッツ型ねじ口ガラス遠心管等。  
びんについては試験前に高圧蒸気滅菌しておく。

##### 4.3.3. 滅菌済み使い捨て器具

ピペット, 遠沈管等

##### 4.3.4. 濾紙円板

ペーパーディスク (抗生物質検定用), 厚手, 直径 6 mm (東洋濾紙 (株)) を用いる。同一試験内では同じロットのものを用いる。試験前にガラスのシャーレもしくはびんに入れて高圧蒸気滅菌しておく。

##### 4.3.5. アルミ箔

試験前に必要量を高圧蒸気滅菌しておく。