

では b 施設では、自社に十分な実験機器がなかったため、他施設を借用して試験を実施した結果、実験環境の制御に困難性があったことが挙げられている。

表. 施設内再現性

施設	被験物質	In vivo	可能性
b	A (Anthracene)	P	EまたはP
	B (Amiodaron)	P	NまたはE
	C (CHD)	N	EまたはP
	D (CPZ)	P	NまたはEまたはP
	F (SLS)	N	NまたはP
c	B (Amiodaron)	P	NまたはE (cut-off値ぎりぎり)
	H (6-MC) *	N	NまたはP

(* 光溶血試験で1回目と2回目が大きく異なっているが、追加試験で補正されているため評価には影響を与えない。(1回目と2回目が大きく異なる場合は3回目を実施して提出する。2回のデータを得ることがSOPに記載)

5.2.5 施設間再現性

施設間再現性は必ずしも良いとは言えなかった。すなわち、Acridine、BMDM、CHD 及び Bithionol 以外では施設間で結果が一致せず、半数以上の物質で再現性が不良であった。なお、CHD と Bithionol では *in vivo* における判定では陰性であるが、本法ではすべての施設で陽性と判定された逆の結果が得られている。ただ、陽性物質が各施設共通で陰性と判断されることはなかった。

表. 施設間再現性、その1

物質名(略名)	コード	In vivo 判定	施設コード					
			a	b	c	d	e	f
Anthracene	A	P	P	E	E	P		
Amiodaron	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

感度、特異度ならびに一致度を表に示す。擬陽性判定を陽性判定と見なした場合に *in vivo* 判定との一致率は、b 施設を除外した 5 施設では 70%、すべての施設では 64%であった。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。

表. 施設間再現性、その 2

	施設コード (b を除く)					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%)

	施設コード (b を含む)						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 (87%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	23/36 (64%)

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. 施設間再現性、その3

物質	施設	酵母	赤血球	総合	物質	施設	酵母	赤血球	総合
A Anthracene (P)	a	P	(E)	P	F SLS (N)	a	N	N	N
	b	E	E	E		b	N	P	P
	c	E	N	E		c	N	N	N
	d	E	P	P		d	N	N	N
B Amiodaron (P)	a	P	(N)	P	G Acridine (P)	c	P	(P)	P
	b	N	N	N		d	E	P	P
	c	P	(N)	P		e	E	P	P
	d	E	(N)	E		f	E	P	P
C CHD (N)	a	E	P	P	H 6-MC (N)	c	N	N	N
	b	N	P	P		d	E	N	E
	c	N	P	P		e	E	N	E
	d	N	P	P		f	E	N	E
D CPZ (P)	a	P	(P)	P	I BMDM (N)	c	N	N	N
	b	N	E	E		d	N	N	N
	e	E	N	E		e	N	N	N
	f	N	P	P		f	N	N	N
E Bithionol (N)	a	P	(P)	P	36試験中14試験でBatteryでの評価が酵母試験単独から変化しており、両者の組合せが大きな意味を持っている。				
	b	E	P	P					
	e	E	P	P					
	f	E	P	P					

施設間再現性の結果から、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。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。酵母光生育阻害試験、または赤血球光溶血試験単独結果とそれらを組合せた結果と異なる施設が多く、Battery 試験の有用性が認識できた。しかし、*in vivo* と比べて第一次バリデーション試験の評価条件では必ずしも良好な結果とを示したとは言えず、改善の必要があった。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ことが示された。

5.2.6 吸光度測定における波長の影響

赤血球光溶血試験における吸光光度計の波長を 540nm の場合と 525nm の場合とを比較した。525 nm での判定の方が感度、一致度の両面で良い結果が得られた。

表. 吸光度測定における波長の影響

	施設コード (540 nmで評価)						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	94.9
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致度 I	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 (525 nmで評価)						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	94.9
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致度 I	67	33	67	50	67	67	58.3
一致度 II	67	33	83	67	83	67	77.8

感度 II : 陽性物質を陽性または擬陽性と判定した割合
 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

5.3 補完試験結果

第 1 次バリデーション結果にもとづいて、陽性物質として採用した物質が、いくつかの施設でグレーゾーンに落ちており、結果がばらついていることを改善するために、陽性対照である 8-MOP の適用濃度の変更や、Rose bengal を用いたプレインキュベーション時間の検討、光源の種類や光源を覆う暗幕などのプロトコル整備が提案され、酵母光生育阻害試験の補完試験が実施されている。その結果について下記に示す。

5.3.1 酵母光生育阻害試験の結果

第 1 次バリデーション結果と異なり、陽性物質が明確に陽性と判定された。一方、陰性物質が陽性と判定される場合が増加した。d ならびに f 施設の 1 物質のみで結果がばらついたが、全般的に良好な再現性が認められている。

表. 酵母光生育阻害試験の結果

		a			b			c			d			e			f		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Anthracene	P	P	P					P	P		P	P							
Amiodaron	P	P	P					P	P		P	E							
CHD	N	N	N					N	N		N	N							
CPZ	P	P	P											P	P		P	P	
Bithionol	N	P	P											N	N		P	P	
SLS	N	N	N											N	N		E	E	P
Acridine	P							P	P		P	P		P	P		P	P	
6-MC	N							E	E		N	N		P	P		P	P	
BMDM	N							N	N		N	N		N	N		N	N	

5.3.2 施設内再現性

施設内の実験反復で結果の異なった c、d、f 施設での被験物質を表に示す。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、3被験物質については表の通り、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が良くなっており、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。

表. 施設内再現性

施設	被験物質	In vivo	可能性
c	H (6-MC)	N	±または+(赤血球の問題)
d	B (Amiodaron)	P	±または+
f	F (SLS)	N	±または+

判定基準は、一次バリデーションの判定基準と同様の基準を用いた。

表. 補完試験の判定基準

		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

5.3.3 施設間再現性

表. 施設間再現性

物質	施設	酵母	赤血球	総合	物質	施設	酵母	赤血球	総合
A Anthracene (P)	a	P	(E)	P	F SLS (H)	a	N	N	N
	b					b			
	c	P	N	P		e	N	N	N
	d	P	P	P		f	E	N	E
B Amiodaron (P)	a	P	(N)	P	G Acridine (P)	c	P	(P)	P
	b					d	P	P	P
	c	P	(N)	P		e	P	P	P
	d	P	(N)	P		f	P	P	P
C CHD (H)	a	N	P	P	H 6-MC (H)	c	E	N	E
	b					d	N	N	N
	c	N	P	P		e	P	N	P
	d	N	P	P		f	P	N	P
D CPZ (P)	a	P	(P)	P	I BMDM (H)	c	N	N	N
	b					d	N	N	N
	e	P	N	P		e	N	N	N
	f	P	P	P		f	N	N	N
E Bithionol (H)	a	P	(P)	P	Battery での評価が酵母試験単独から変化したのは30試験中4試験まで減少した。				
	b								
	e	N	P	P					
	f	P	P	P					

補完試験における施設間再現性は SLS、6-MC を除いてすべて *in vivo* 結果と一致した。なお、SLS の場合は f 施設のみ擬陽性判定となり、他が陰性判定、6-MC の場合は c 施設のみ擬陽性判定となり、他が陽性判定であった。しかし、第一次バリデーションの結果と比較すると飛躍的にほとんどの化学物質で一致していることが示された。

表. 施設間再現性

物質名(略名)	コード	In vivo 判定	施設コード				
			a	c	d	e	f
Anthracene	A	P	P	P	P		
Amiodaron	B	P	P	P	P		
CHD	C	N	P	P	P		
CPZ	D	P	P			P	P
Bithionol	E	N	P			P	P
SLS	F	N	N			N	E
Acridine	G	P		P	P	P	P
6-MC	H	N		E	N	P	P
BMDM	I	N		N	N	N	N

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 2 物質（CHD および Bithionol）であった。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ことが示された。

表. 施設間再現性

	施設コード(赤血球光溶血試験は540nmの値を使用)					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%)	13/13 (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 (47%)
一致度	4/6 (67%)	4/6 (67%)	5/6 (83%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	18/30 (60%)

SOP 改訂により、陽性物質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 改訂の成果があったものと考えられた。また、バッテリーシステムでの判定は、感度 I、感度 II とともに 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、更に特異度も改善されたことから、SOP 改訂は有用であったと考えられた。陽性物質の阻止帯の差の施設間差がやや大きくなったことは、SOP 改訂の一つの結果と考えられる。さらに、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 5 物質で、前研究の 2 物質より多かった。

6. 試験法の正確性

本試験法が *in vitro* 光毒性スクリーニング法として、未知の化学物質に光毒性が存在するかどうかを容易に知ることができ、さらに評価法の最も重要な所要条件と考えられる偽陰性や偽陽性が少ないことも正確性に影響するが、とくに偽陰性すなわち陽性物質を陰性と誤って判断することが 100%ない実験方法である必要がある。さらに実験方法の結果が正確で頑健性があることが実験方法としての信頼性を大きく左右するものであると考えられる。一次バリデーション試験の結果では、施設内再現性は施設 b で特に悪く、さらに施設間再現性も 4 物質 (Acridine、BMDM、CHD 及び Bithionol) を除いて結果が一致しなかった。一次バリデーション試験ではかなり大幅なデータクリーニングが必要であり、施設 b の結果を除外して擬陽性判定を陽性判定と見なした場合でも *in vivo* 判定との一致率は 70% であり大きくばらついた。一次バリデーション試験では全く不正確な結果であり試験プロトコルの見直しが必要であった。酵母光生育阻害試験の陽性結果の判定基準の変更やプレインキュベーション時間の設定等を行ない補完試験が実施された。補完試験のプロトコルでは擬陽性判定が少なくなり、施設内再現性及び施設間再現性共に一次バリデーション試験に比して良好な結果が得られ正確性が向上した。

今回のバリデーションでそれぞれの試験結果の正確性に影響を及ぼす主な要因として、光源、評価基準、その他の項目に分けて考える。

6.1 光源

使用された光源の種類や強さは実験の正確性に大きな影響を与えられと考えられる。当初本実験方法を資生堂(株)が開発した時点の光源はトランスイルミネーター (UVA) であったが、バリデーション試験では人工太陽光であるソーラーシミュレーター (SOL500、Dr. Honle 社製) が使用された。このソーラーシミュレーターでは太陽光と類似したスペクトル分布が得られ、UVB から可視光までの光波長も含まれている。さらに、照射線量についても、光源の変更に伴い変更が行われたが、酵母光生育阻害試験においては、最終的に阻止帯を明瞭化するために照射量を当初の $8.5/\text{cm}^2$ から $20\text{J}/\text{cm}^2$ としたことも実験の正確性の向上に貢献したものと考えられる。

各施設の実験環境が異なることから、第一次バリデーションの際に SOP に記載されていなかったことと相まって各施設独自の工夫がみられた。その中で光照射中に暗幕を使用した施設と使用しなかった施設があった。暗幕を用いれば反射により光照射の強度が上がり、さらに暗幕で密閉された状態で環境温度が上昇することが考えられ、温度上昇が細胞に与える影響も懸念された。そのため暗幕の有無も施設間におけるバラツキの原因の 1 つで、実験結果の正確性に影響することが考えられた。なお、SOP を改訂した補完試験では統一され、結果のバラツキが少なくなり、さらに導き出された結果が正確となったと考えられる。

6.2 評価基準

酵母光成育阻害試験では、第一次バリデーションでは、阻止帯の直径を 2mm 以上を陽性、2mm 未満を陰性とした。このため、陽性扱いとなった本来陰性であるべき物質も数多くみられ、これが一致率の低下を招いたことから、改訂された SOP では、5mm 以上を陽性、5mm 未満を陰性として補完試験を行った結果、一致率と施設間のバラツキの大幅な向上がみられた。また、陽性対照である 8-MOP の場合に 0.1 mg/mL では阻止帯が小さくはっきりしていないことから、明らかな阻止帯が観察された 1mg/mL を陽性対照とし、陽性対照物質の試験条件として濃度 1 mg/mL と設定することが結果の正確性に寄与したと考えられる。

6.3 その他

酵母光成育阻害試験の第一次バリデーションではプレインキュベーションの設定はなかったが、プレインキュベーションを行うことによって最終の阻止帯の差が大きくなることを見いだされた。その結果、SOP を改訂した補完試験ではプレインキュベーション時間を 5 時間と設定することが、阻止帯により明確な差をつけることができ、結果としてより正確な結論を導き出された。また、赤血球光溶血試験における吸光度測定における波長の影響についても、吸光光度計の波長を 540nm の場合と 525nm の場合とを比較した結果、525nm での判定の方が感度、一致度の両面で良い結果が得られた。しかし、今回の補完試験プロトコルでは各施設の吸光光度計のフィルター入手等の問題から 540nm が採用された。

一般的に実験の正確性に影響する要因として、酵母ならびに赤血球の種類やロットによるバラツキ、実験器具や材料の違いによるバラツキ、実験環境や実験者の習熟度、SOP 遵守などが考えられる。改訂された SOP ではこれらの点も記載され、実験方法の結果の正確性に貢献していると考えられる。とくに、今回の第一次バリデーション結果と、補完後の最終結果を比較すると、正確性が向上していることが明らかである。補完実験の SOP 最終プロトコルによって、本法を用いて未知物質の光毒性を予知することが十分に可能であり他の方法による光毒性試験結果と正確性に劣らない方法であると結論づけられる。

7. 試験法の信頼性 (*in vivo* との比較)

陽性化合物 4 種と陰性化合物 5 種の計 9 種の化合物を用いた第一次バリデーションでは、データ解析から除外することが妥当と判断された 1 施設のデータを除き且つ擬陽性判定を陽性とみなした場合、感度は 100%、特異性は 47%、一致度は 70%をそれぞれ示した。また、判定基準あるいはプレインキュベーション時間等について見直しを行って実施された補完試験では、陽性対照の判定はすべての施設で陽性判定となる改善点が認められ、false positive は存在したものの、false negative は示されず、陽性化合物の見落としを少なくする改善が行われた。今回のバリデーションで用いられた化合物は 9 種類と限られており、当結果のみから *in vivo* の予測性を判断することは困難であるが、3T3-NRU 法に近い評価が可能な試験

系であると言える。

今後、当該試験系を用いてのデータが蓄積され、*in vivo* との相関性が保証されるまでは、一次スクリーニングとしての活用が望ましく、被験化合物の光毒性評価においては、動物試験の併用を考慮すべきと考えられる。また、経口投与等による全身暴露を考えた場合には、代謝活性化系の導入についても検討すべきと考えられる。

8. データの質

8.1 資生堂における検討試験

8.1.1 GLP 原則の遵守

施設が GLP 認定施設でないこと、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」と見なしてよいと考えられた。

8.1.2 プロトコル違反

赤血球光溶血試験のまとめのデータには被験物質ごとに 3 回の試験結果しか示されていなかったが、実際にはより多くの試験が行われていたとの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。本件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時に終了するとのことは試験法 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ではないとされた。また、このようにすると 3 回の試験結果の平均を取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ない限り行った試験結果すべ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。

8.1.3 その他、試験実施上の問題点等

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、技術的には問題ないと考えられる。

8.1.4 データの信頼性

生データと個別データ、まとめの結果と対比については、多くのデータについて二次データとの相同性が確認されたことから、データの信頼性に問題はないと考えられた。

8.2 一次バリデーション試験

8.2.1 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ないと考える。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 施設でないところには、試験開始前に GLP 教育をより徹底することや、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し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。

8.2.2 プロトコル違反

プロトコ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された。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されている。

8.2.3 その他、試験実施上の問題点等

施設内のバラツキ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、光源の特長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。

8.2.4 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、生データとの突合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。

8.3 補完試験

補完試験に参加した 5 施設は、いずれも一次バリデーション試験に参加し、酵素光生育阻害実験のデータについて評価を受けた経験を有することから、技術的な側面からデータの質への懸念はないものと考えられた。光毒性試験代替法バリデーション報告書（2008 年 1 月 7 日）の「3-6 実験条件の記録」に、実験は GLP の精神に則って実施され、定められた様式で、測定機器や実験条件を記録したと記載されている。さらに、一次バリデーション試験では多くの記載ミスや転記ミスがあったが、補完試験では一次バリデーション試験の経験を生かしてデータシートを改善した結果、転記ミスが 2 件のみに減少したことから、補完実験のデータの信頼性に問題はなかったと考えられた。補完試験後の中間報告会において、阻止円の測り方を SOP に文章として記載したほうが良いとの意見が出され、SOP

の改訂がなされたことから、データに影響する要因について適切な対応がなされているものと考えられた。

9. 他の科学的な報告

Battery 法に関わる 2 報の論文について、以下に記述する。

9.1 A Strategic Approach for Predicting Phototoxicity of Cosmetic Ingredients

Altern. Animal Test. Experiment., 9(1), 29-39 (2002)

赤血球光溶血試験法、酵母光生育阻害試験法及び 3T3-NRU 光毒性試験法についての評価を行うとともに、それぞれの試験法を組み合わせた時の予測性についても評価を行った。実験では、*in vivo* で陽性を示す化合物 9 種及び陰性を示す化合物 14 種の計 23 種の化合物を用いた。実験の結果、酵母光生育阻害試験法が最もモルモットを用いた *in vivo* 試験の成績と一致する結果を示した (Table 1)。各試験法それぞれに false negative が認められたが、赤血球光溶血試験法と酵母光生育阻害試験法を組み合わせた Battery 法では、false negative を除外することが可能であった (Table 1)。

さらに、赤血球光溶血試験法、酵母光生育阻害試験法及び 3T3 NR 光毒性試験法のそれぞれの組み合わせによる光毒性評価について検討を行った。赤血球光溶血試験法と酵母光生育阻害試験法、3T3-NRU 光毒性試験法と赤血球光溶血試験法の組み合わせの評価では、単独での評価で見られた false negative を除外することができた (Table 2)。

以上、異なるメカニズムによる光毒性発現を検出する試験法を組み合わせることにより、予測性の向上が認められた。また、不溶性化合物の評価が可能な点を含めると、赤血球光溶血試験法と酵母光生育阻害試験法を組み合わせた Battery 法の有用性が示されたものと考えられる。

Table 1 Evaluation of *in vitro* methods in terms of five parameters

Parameter	RBC assay	Yeast assay	NRU PT	Battery system
			<i>using BALB/3T3 clone A31</i>	RBC-Yeast
Sensitivity	67%	89%	67%	100%
Specificity	71%	79%	79%	64%
Predictive value (+)	60%	73%	67%	64%
Predictive value (-)	77%	92%	79%	100%
Equivalence	70%	80%	72%	76%
False negative	8-MOP	Phantolid	Phantolid	-
	5-MOP		Galaxolide	
			TCSA	

Table 2 Evaluation of the three battery systems

Parameter	Battery system		
	RBC-Yeast	Yeast-NRU PT	NRU PT-RBC
Sensitivity	100%	89%	100%
Specificity	64%	73%	64%
Predictive value (+)	64%	67%	64%
Predictive value (-)	100%	92%	100%
Equivalence	76%	83%	76%
False negative	-	Phantolid	-

9.2 Effects of Light Sources on the Prediction of Phototoxicity by the Yeast Growth Inhibition

Phototoxicity Assay and the Red Blood Cell Photohemolysis Assay

Altern. Animal Test. Experiment., 10(1), 1-17 (2004)

赤血球光溶血試験法、酵母光生育阻害試験法及び Battery 法において、光源の差異が試験成績に及ぼす影響を検討した。実験では、24 種の化合物を用いた。光源は、solar simulator と UVA 照射器を用いた。

いずれの試験法においても、光源の違いによる試験成績へ影響は認められなかった (Table 3)。

Table 3 Availability of the battery system in terms of correlation parameters.

Parameters*	YGI PT (%)		RBC PH (%)		Battery system (%)	
	Solar	UVA	Solar	UVA	Solar	UVA
Sensitivity	78	89	67	67	100	100
Specificity	87	80	73	73	73	67
Predictive value (+)	78	73	60	60	69	64
Predictive value (-)	87	92	79	79	100	100
Equivalence	81	81	71	73	81	77

Correlation parameters were calculated using the data for 24 cosmetic ingredients in Table 4.

*: Parameters reported by Balls *et al.* (1990).

Solar simulator を光源とし、赤血球光溶血試験法、酵母光生育阻害試験法、Battery 法及び 3T3-NRU 光毒性試験法の比較を行った。なお、3T3-NRU 光毒性試験法のデータは EU/COLIPA で実施されたバリデーションの結果を用いた。検討の結果、2 種の試験法を組み合わせるにより (Battery 法)、単独での評価に比較して光毒性予測力が向上することが認められた。また、Battery 法は、3T3-NRU 光毒性試験法と同等の光毒性予測力を持つことが示された。

Table 4 Comparison of correlation parameters for the YGI PT assay, the RBC PH assay and the battery system with the use of the solar simulator.

Parameters*	YGI PT (%)	RBC PH (%)	Battery system (%)	3T3 NRU PT (%)
Sensitivity	83	67	100	100
Specificity	75	63	63	50
Predictive value (+)	71	57	67	60
Predictive value (-)	86	71	100	100
Equivalence	79	64	79	71

Correlation parameters were calculated using the data for 14 chemicals in Table 4, *i.e.*, musk ambrette, 8-MOP, 5-MOP, 6-MC, EHMC, HMB, HMBS, piroxicam, CPZ, bithionol, TCSA, rose bengal, acridine and anthracene.

*: Parameters reported by Balls *et al.* (1990).

10. 3Rs への対応

酵母光生育阻害試験については、動物を使用しないことから、動物福祉面から代替法として、問題ないものとする。赤血球光溶血性試験ではヒツジの血液を用いている。ヒツジの血液については、ヒトの血液での代用可能性もあるが、本試験にて、陽性対照物質と3

被験物質を評価する場合に必要なヒツジ赤血球量は血液約 2mL であり、供血用動物の健康面、福祉面に適切な配慮がなされれば、同一動物から間隔を空けて繰り返し採血することは可能であり、動物福祉面で特段の問題はないものと考えられた。

11. 試験法の有用性と限界（コスト、時間面からの妥当性など）

試験系である緬羊保存血ならびにドライイーストとも高価ではなく、光源装置を除くと、高価で特殊な機器や試薬等は必要としないことから、本試験法はコスト面で特に問題はないものと考えられた。また、3T3-NRU 法は水に難溶性の物質では評価結果にバラツキが大きくなる可能性が示されているが、本試験法は水に難溶性の物質に対応できる方法として、提案されている。さらに、本試験法は必ずしもクリーンベンチでの操作を必要としない簡便な方法であることから、技術のトランスファーは比較的容易と考えられた。しかしながら、酵母試験における非水溶性物質の評価については更に検討が必要とのことから、水に難溶性の物質への対応可能性を本試験法の有用性の根拠することについては明確ではないものと考えられた。

本試験法の実施に費やす時間は、個々の試験はいずれも 1 日以内であるが、バッテリー試験法であり、単独の試験では陰性結果を判定できないことから、単独の試験結果で評価する 3T3-NRU 法より、時間を要する。いずれの試験系も陽性対照物質が設定されていることから大きな問題ではないが、緬羊保存血やドライイーストの反応性のロット間差の有無やドライイーストの保存条件や期間の試験データへの影響について、SOP 等で言及する必要性について、考慮すべきと考えられた。

提案のバッテリー試験法を受け入れる条件として、3T3-NRU 法単独より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、それとも一致性が同等であっても、他のメリットがあれば、良いのかについて、多施設バリデーション開始前に本試験法の評価委員会による一次評価において検討され、同等ならば、受け入れても良いとの見解が示されている。補完実験を含む多施設バリデーションの結果、疑陽性も陽性と判定することにより、3T3-NRU 法とほぼ同等の感度であることが示されていることから、試験法として有用であるものと考えられた。

12. その他（特許の有無など）

本試験法に関する特許は申請されていない。

13. 文献

OECD Guidance for Testing of Chemicals: 432, In vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test,

OECD/OCED., 13 April 2004

大野泰雄ら、Balb/c 3T3 再紡を用い Neutral red 取り込みを指標とした光毒性代替法の評価結果報告 Altern. Animal Test. Experiment., 10(2), 50-157 (2004)

Sugiyama M. et al., A Strategic Approach for Predicting Phototoxicity of Cosmetic Ingredients. Altern. Animal Test. Experiment., 9(1), 29-39 (2002)

Mori M. et al., Effects of Light Sources on the Prediction of Phototoxicity by the Yeast Growth Inhibition Phototoxicity Assay and the Red Blood Cell Photohemolysis Assay. Altern. Animal Test. Experiment., 10(1), 1-17 (2004)

4) *In vitro*発熱性物質試験の専門家による第三者評価

研究要旨

従来の発熱性物質試験に代わるとされる *in vitro*発熱性物質試験法について、採取したヒト末梢血単核細胞 (PBMC) から分泌されるサイトカイン (インターロイキン ; IL) の量を指標とする 5 種の試験法に関する欧米の報告書等をもとに、専門家による第三者評価を進めた。今回提案された *in vitro* 発熱性物質試験は、ウサギの使用数を削減可能とし、また、作用機序に立脚した発熱性物質試験の新たな方向性として評価でき、さらに、バリデーションでのデータの扱いに関しても納得のできる基準を満たしていると考えられる。しかし、ウサギを用いた発熱性物質試験との互換性については不明な点が多く、この試験法を代替法するには問題があるとされた。

A. 研究目的

従来の発熱性物質試験に代わるとされる *in vitro* 発熱性物質試験法について、採取したヒト末梢血単核細胞 (PBMC) から分泌されるサイトカイン (インターロイキン ; IL) の量を指標とする 5 種の試験法に関する欧米の報告書等をもとに、専門家による第三者評価を進める。

に記載されている。測定指標としては、インターロイキン (IL) -1 β (IL-1 と記す) または IL-6 が使われた。

- 1) 全血 (Whole Blood : WB) /IL-1
- 2) 保存血 CryoWB/IL-1
- 3) WB/IL-6
- 4) PBMC/IL-6
- 5) 単球細胞株 MM6/IL-6

B. 研究方法

B-1) 光毒性評価委員会委員

委員長

小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所)

委員

中澤憲一 (国立医薬品食品衛生研究所)

吉村 功 (東京理科大学)

篠田和俊 (医薬品医療機器総合機構)

西岡吾朗 (扶桑薬品工業)

石井 健 (大阪大学)

C. 結果および考察

今回提案された *in vitro* 発熱性物質試験は、ウサギの使用数を削減し、また、作用機序に立脚した発熱性物質試験の新たな方向性として評価できる。さらに、バリデーションでのデータの扱いに関しても納得のできる基準を満たしていると考えられる。しかし、ウサギを用いた発熱性物質試験との互換性については不明な点が多く、この試験法の代替法とするには、問題がある。国内ではウサギ発熱性物質試験からエンドトキシン試験への移行の問題も残されており、これに優先して独立した代替法とすることには無理がある。しかしながら、エンドトキシン試験が使用できないような特殊な状況やウサギとヒトでの発熱性に関する種差が想定されるような状況において、ウサギ発熱性物質試験と併用するなど、限定的な使用については推奨できよう。このような *in vitro* 発熱性物質試験が科学的根拠に基づいた研究により、さらに広範囲な状況で使用可能となることが望まれる。

B-2) 方法

欧米の評価で用いられた以下の資料を用いた。

- ① ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) Test Method Evaluation Report
- ② ICCVAM Background Review Document (BRD)
- ③ EC STATEMENT ON THE VALIDITY OF IN-VITRO PYROGEN TESTS
- ④ ECVAM (European Center for the Validation of Alternative methods) BRD

In vitro 発熱性物質試験として、ボランティアから供与を受けた全血を用い、採血後 4 時間以内に実施すべき試験が 2 種、保存血 (凍結保存) を用いる試験が 1 種、全血から取り出した PBMC (末梢血単核細胞) を用いる試験が 1 種、細胞株を用いる試験が 1 種以下のよう

D. 結論

本試験法は、ウサギの使用数を削減し、また、作用機序に立脚した発熱性物質試験の新たな方向性として評価できる。さらに、バリデーションでのデータの扱いに関しても納得のできる基準を満たしていると考えられる。

しかし、ウサギを用いた発熱性物質試験との互換性については不明な点が多く、この試験法を代替法するには問題があるとされた。

委員会代替法の第三者評価報告書

E. 資料

資料 4-1 *In vitro* 発熱性物質試験評価

*In vitro*発熱性物質試験評価委員会代替法の第三者評価報告書

平成22年(2010年)1月18日

発熱性物質試験評価委員会

発熱性物質試験評価委員

中澤憲一（国立医薬品食品衛生研究所・薬理部）

篠田和俊（医薬品医療機器総合機構）

小島肇（国立医薬品食品衛生研究所・薬理部）

吉村功（東京理科大学）

西岡吾朗（扶桑薬品工業）

石井健（大阪大学）

オブザーバー

内藤 誠之郎（国立感染症研究所）

用語集

BET : Bacterial Endotoxin Test : Limulus ameocyte Lysate (: LAL) TESTING (エンドトキシン試験)

BRD: Background Review Document

ECVAM: European Center for the Validation of Alternative methods

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

GD: Guidance Document

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods

IL: Interleukin (インターロイキン)

IL-1 β : Interleukin 1 β

IL-6: Interleukin 6

IL-8: Interleukin 8

LAL: Limulus ameocyte Lysate (カプトガニ血球抽出物)

LPS : Lipopolysaccharide (リポ多糖)

LTA:Lipoteichoic acid (リポテイコ酸)

MM: Monocytoid Cell Line Nono Mac (単球細胞株)

OECD : Organization for Economic Co-operation and Development

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell (末梢血単核細胞)

RPT : Rabbit Pyrogen Test (ウサギ発熱性物質試験)

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

WB: Whole Blood (全血)