

- 中井智博、今村匡志、松村奨士、真田尚和、井上健司、武藤重治、萩尾宗一郎、林亜耶、高柳智美、荻原庸介、前田晃央、成見香瑞範、寺島ゆかり、高沢博修、小川いづみ、大山ワカ子、涌生ゆみ、川迫一史、佐野正樹、大橋信之、森田健、小島肇、林真、本間正充：反復投与による肝臓小核試験法の有用性の検討：MMS共同研究の報告、日本環境変異原学会第41回大会、グランシップ 静岡(2012.11)
- 21) 大山ワカ子、成見香瑞範、岡田恵美子、藤石洋平、高柳智美、堀妃佐子、松村奨士、池田直弘、夏目匡克、田中仁、高島理恵、松本浩孝、須井哉、浅野哲秀、森田健、小島肇、本間正充、濱田修一、林 真：反復投与による消化管小核試験法の有用性の検討：MMS共同研究の報告、日本環境変異原学会第41回大会、グランシップ 静岡(2012.11)
- 22) 小島 肇：化粧品の安全性を考える、「化粧品のスズメ」、東京農業大学世田谷キャンパス(2012.12)
- 23) 小島 肇：25周年記念講演「日本動物実験代替法学会バリデーション委員会とJaCVAM」、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 24) 山口 宏之、小島 肇、竹澤 俊明：シンポジウム：コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを用いたAMET解析に有用な培養システム「コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを利用した眼刺激性試験法の開発現状」、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 25) 内野 正、清水久美子、竹澤俊明、山下邦彦、小島 肇、五十嵐良明、秋山卓美：シンポジウム：コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを用いたAMET解析に有用な培養システム「コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを利用した皮膚感作性試験法の開発現状」、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 26) 小島 肇、安中 希、土屋成一朗、吉武裕一郎、許 睿、鈴木 克、嶋谷 亘、梶田明美、中村 牧、渡辺美香、中嶋 圓、坂本興嗣、竹田竜嗣、久間將義、池田英史、稲垣愛美、棟近由記美、山本 裕、笠原利彦、福田隆之、仲原 聡、渡辺真一、倉田隼人、篠田伸介、加藤雅一：培養角膜モデルLabCyte CORNEA-MODEL24を用いた眼刺激性試験代替法共同研究、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 27) 木村 裕、渡辺 美香、斎藤 るみ子、鈴木 紀之、岩城 知子、金子 愛、高田めぐみ、田中 裕美、渡辺 文、山影 康次、斎藤 幸一、中島 芳浩、近江谷 克裕、酒井 綾子、大森 崇、山崎 晶次郎、小島 肇、田中 憲徳、相場 節也：IL-8 Luc assayの施設間差試験-Phase I, Phase II aの結果ならびに今後の展望-、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 28) 簾内 桃子、福田 隆之、池田 英史、鄭 美淑、大森 崇、田中 裕美、山影 康次、萩野 滋延、小島 肇：SIRC-CVS試験を用いた眼刺激性評価代替法の国際バリデーション研究 (I)、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 29) 岩瀬 裕美子、山本 敏誠、若栗 忍、尾上 誠良、世戸 孝樹、大崎 尚人、高木 広憲、戸田 嗣人、中村 和希、松本康浩、川上 哲、細井 一弘、小島 肇：医薬品の光安全性評価のための Reactive Oxygen Species (ROS)アッセイ-JaCVAM多施設バリデーション研究一、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 30) 榊原 隆史、六川 潤美、伊藤 浩太、河村 公太郎、古川 正敏、藤平司郎、市戸等、並木 正人、平賀武夫、小島肇、松浦正男：眼刺激性評価のための牛角膜を用いた混濁度および透過性試験法 (BCOP法)、日本動物実験代替法学会 第25回大会、慶応義塾大学芝共立キャンパス(2012.12)
- 31) 小島 肇：iPS細胞を用いた安全性評価試験が行政的に受け入れられるために、日本学術会議薬学委員会シンポジウム 「iPS細胞研究の創薬への応用」、日本学術会議講堂、東京(2013.1)

- 32) 古川 正敏、六川 潤美、榊原 隆史、伊藤 浩太、藤平 司郎、平賀 武夫、小島 肇、松浦 正男：眼刺激性評価のための角膜を用いた混濁度および透過性試験法 (BCOP法) - 病理組織学的検査を中心に -、第29回日本毒性病理学会総会および学術集会、つくばフロンティアセンター(2013.1)
- 33) 小島 肇：最近の動物実験代替法の開発状況、革新的な医療機器の開発と動物実験代替法の最前線、富士ソフトアキバプラザ 5階富士ソフトアキバホール、東京(2013.2)
- 34) H Kojima, N Annaka, S Tsuchiya, Y Yoshitake, R Xu, M Suzuki, W Shimatani, A Kajita, M Nakamura, M Watanabe, M Nakajima, K Sakamoto, R Takeda, M Hisama, H Ikeda, M Inagaki, Y Munechika, Y Yamamoto, T Kasahara, T Fukuda, S Nakahara, S Watanabe, H Kurata, S Shinoda, M Katoh : Collaboration study on eye irritation alternative method with human corneal model; LabCyte CORNEA-MODEL24, 52th Society Of Toxicology, San Antonio, Texas (2013.3)
- 35) W Casey, P Ceger, J Strickland, L Rinckel, E Grignard, Susanne Bremer, H Kojima, SY Han, W Stokes: Regulatory Acceptance of the BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method, 52th Society Of Toxicology, San Antonio, Texas (2013.3)
- 36) J Kulpa-Eddy, R McFarland, G Srinivas, A Walker, M Halder, H Kojima, K Brown, H Draayer, R Sebring, V Doelling, B Jones, N Johnson, L Rinckel, W Casey, W Stokes: International Workshop on Alternative Methods for Veterinary *Leptospira* Vaccine Potency Testing, 52th Society Of Toxicology, San Antonio, Texas (2013.3)
- 37) T Toda, S Onoue, Y Seto, H Takagi, N Osaki, S Kawakami, Y Matsumoto, Y Iwase, T Yamamoto, S Wakuri, K Hosoi, K Nakamura, and H Kojima : Intra- and inter-laboratory validation study on reactive oxygen species (ROS) assay for photosafety evaluation of pharmaceuticals, 52th Society Of Toxicology, San Antonio, Texas (2013.3)
- 38) 小島 肇：動物モデルの必要性、日本薬学会第 133年会、横浜(2013.3)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

I. 添付文書

- 資料 1) 眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS 細胞毒性試験 データ解析報告書 (Version 0.6)
- 資料 2) 眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS 細胞毒性試験 データ解析報告書 (Version 0.7)
- 資料 3) ヒト 3 次元培養角膜上皮 LabCyte CORNEA-MODEL24 眼刺激性試験共同研究集計報告書 (Version 1.0)

**眼刺激性試験代替法  
SIRC-CVS 細胞毒性試験  
データ解析報告書  
(Version 0.6)**

2012/10/15  
大森崇

## 目次

1. はじめに.....	3
2. データ解析の方針 .....	4
2.1 解析のためのデータセット .....	4
2.2 実験成立のための基準.....	4
2.3 集計とデータ解析の単位.....	4
2.4 判定.....	4
2.5 データの図示.....	4
2.6 施設内再現性と施設間再現性 .....	5
3.1 物質別各実験の IC50 .....	6
3.2 プロトコールに基づく判定結果の施設内再現性.....	11

## 1. はじめに

SIRC-CVS 細胞毒性試験法は Crystal violet が生細胞の細胞膜に入り込んで染色する性質を利用した試験方法である。この試験法は、眼に対する眼刺激性の評価（刺激の有無）を行う際の代替法として期待されている。

現在、JaCVAM がスポンサーになり、この試験法のバリデーション研究が実施されている。すでに、3 施設による技術移転性の確認を目的とした Phase I 研究が終了している。現在、主に施設内、施設間再現性を検討するための Phase II 研究が 3 施設で実施中である。大規模な Phase II 研究のリスクを避けるため、Phase II 研究は Phase IIa 研究と Phase IIb 研究の 2 つに分けられて実施されることになっている。初めに Phase IIa 研究として、コード化された 5 物質について、各物質につき 1 つの判定が行われるため試験が 3 回繰り返されている。この検討が被験物質のコード下で、良好な結果であった場合には、引き続き Phase IIb 研究として、コード化された 15 物質について、各物質につき 1 つの判定が行われるため試験が 3 回繰り返されている計画となっている。

本稿では、Phase IIa 研究の結果を示す。最終的な、関連性の解析は、Phase IIb 研究が終了した後、統合したデータセットを用いて実施される予定である。ここで示す解析の目的は、施設内、施設間の再現性の検討であり、これが良好だと判断された場合、引き続き実施されることが予定されている Phase IIb 研究に進むことになっている。

本報告書は、VMT が Phase IIa 研究の結果を議論するための資料として作成されている。このため、被験物質はすべてコード化されたままで記載されている。また、本報告書は VMT で議論を行うためのものであるため、結果に対するいかなる考察も行っていない。

## 2. データ解析の方針

### 2.1 解析のためのデータセット

データの集計は、この検討のために構築されたデータセットに基づき行った。このデータセットは事前に作成したデータシート上で自動的に計算される IC50 の値を読み込むことで構成した。なお、ここで用いたデータシートは、試験プロトコール(第 1.12 版)に対応している。

被験物質の情報を利用するために別のデータセットを作成した。このデータセットは、実行委員長が作成したファイル(SIRCV\_PhaseIITS コードリスト.xlsx)に基づき作成した。

解析は、これら 2 つのデータセットを併せて用いた。

### コード

データセットでは、被験物質のコードは 01~05 とした。また、各施設は A~C の数値にコード化した。

### 2.2 実験成立のための基準

プロトコールに記載されている試験成立条件はすべてデータシート上で判定できるようになっている。この解析で用いるデータはすべて基準が満たされたデータのみについてである。

### 2.3 集計とデータ解析の単位

本報告で示す解析は、2.2 に示したように実験成立のための基準の適合結果と得られたデータに基づく解析結果である。

### 2.4 判定

プロトコールに記載された判定は 3 回の実験の初めの 2 回結果が一致していれば、その結果を採用し、2 回の結果が一致しているものを採用するというものである。ただし、この研究では、ばらつきの評価のために、すべての物質に対して 3 回の実験が行われている。

### 2.5 データの図示

データ解析に用いるデータは、データシートから読み込んだ各実験の被験物質、比較対照物質、陽性対照物質の IC50 の値である。これが、本報告書で報告するデータの最小単位となる。これらの値を視覚的に把握できるように、それぞれの被験物質ごとに、IC50 を横軸、各施設の試験内の 3 回の実験を縦軸としたグラフを作成する。このグラフにおいて、比較対照物質の IC50 よりも被験物質の IC50 が小さな値を取れば、その実験は陽性という結果を意味する。逆の場合は陰性と判定されることになる。

提案施設の背景データから、比較対照物質の IC50 値の平均値は 1600 $\mu$ g/mL であったことから、この値を参照線として示した。

## 2.6 施設内再現性と施設間再現性

### 主解析

施設内再現性ならびに施設間再現性は、同一の施設内の判定に基づくものとする。

3 回の繰り返しの判定の再現性を確認するために、各施設ごとに各試験回数 of 判定を表にまとめる。

### 副次的解析

本報告書では、1 試験あたり得られる 3 回の実験の IC50 の平均値を平均 IC50 と定義する。比較対照物質、被験物質については、平均 IC50 の値を用いて、施設内再現性を検討する。また、被験物質の平均 IC50 を施設間再現性の検討に用いる。

3 施設それぞれの比較対照物質の施設内再現性の評価のために、平均 IC50 の平均値と標準偏差を表にまとめる。

また、3 施設それぞれの被験物質の施設内再現性の評価のために、各施設における各被験物質の平均 IC50 の平均値と標準偏差を表にまとめる。

### 3. 集計および解析結果

#### 3.1 物質別各実験の IC50

図 3.1.1 から図 3.1.5 に各物質ごとの陽性対照物質、比較対照物質、被験物質の IC50 を示す。

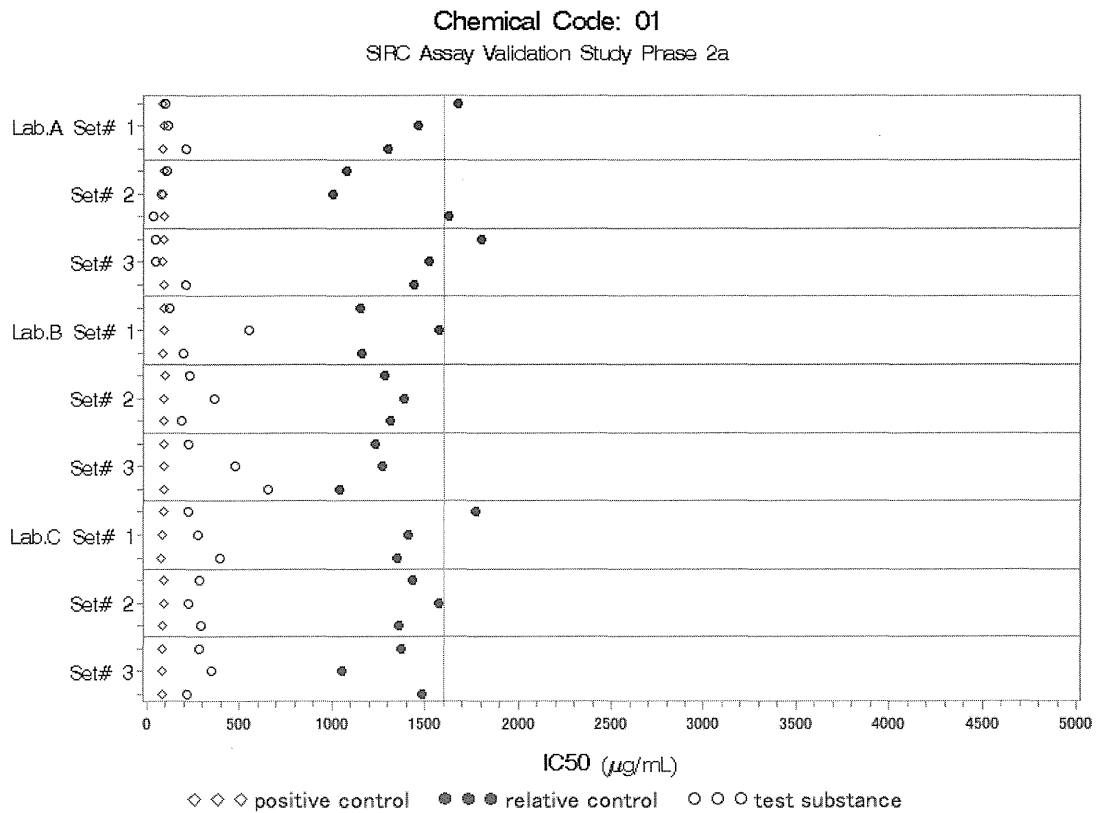


図 3.1.1 物質 01 の IC50



Chemical Code: 02  
SIRC Assay Validation Study Phase 2a

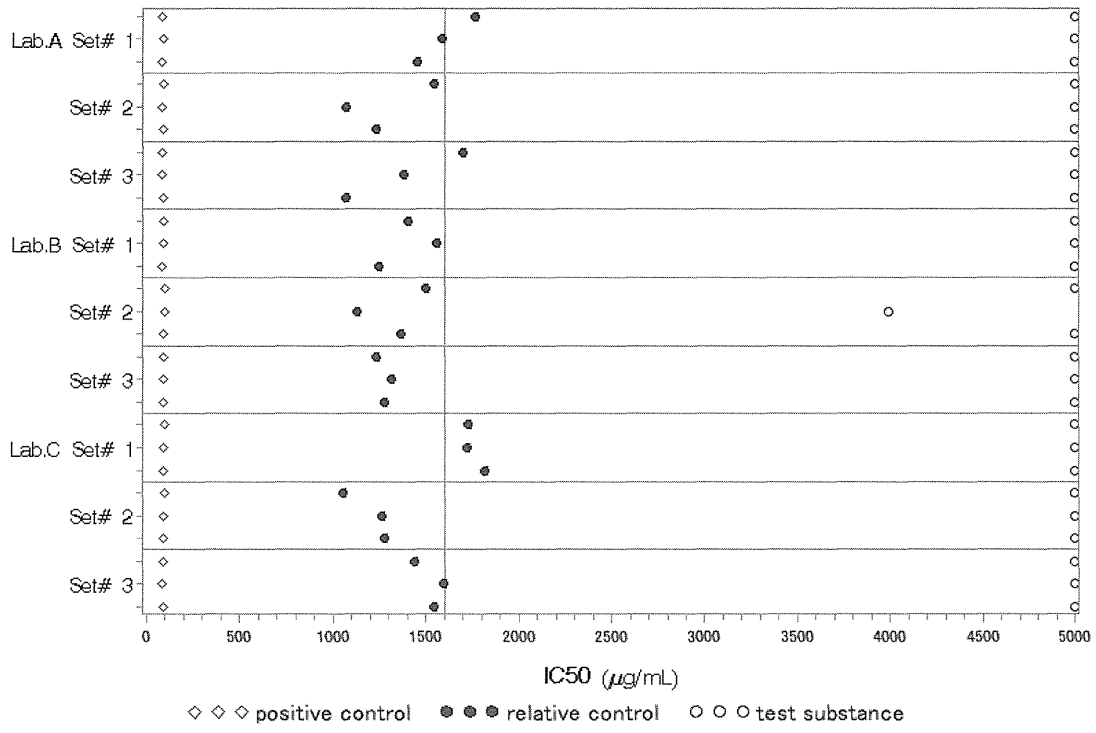


図 3.1.2 物質 02 の IC50

Chemical Code: 03  
SIRC Assay Validation Study Phase 2a

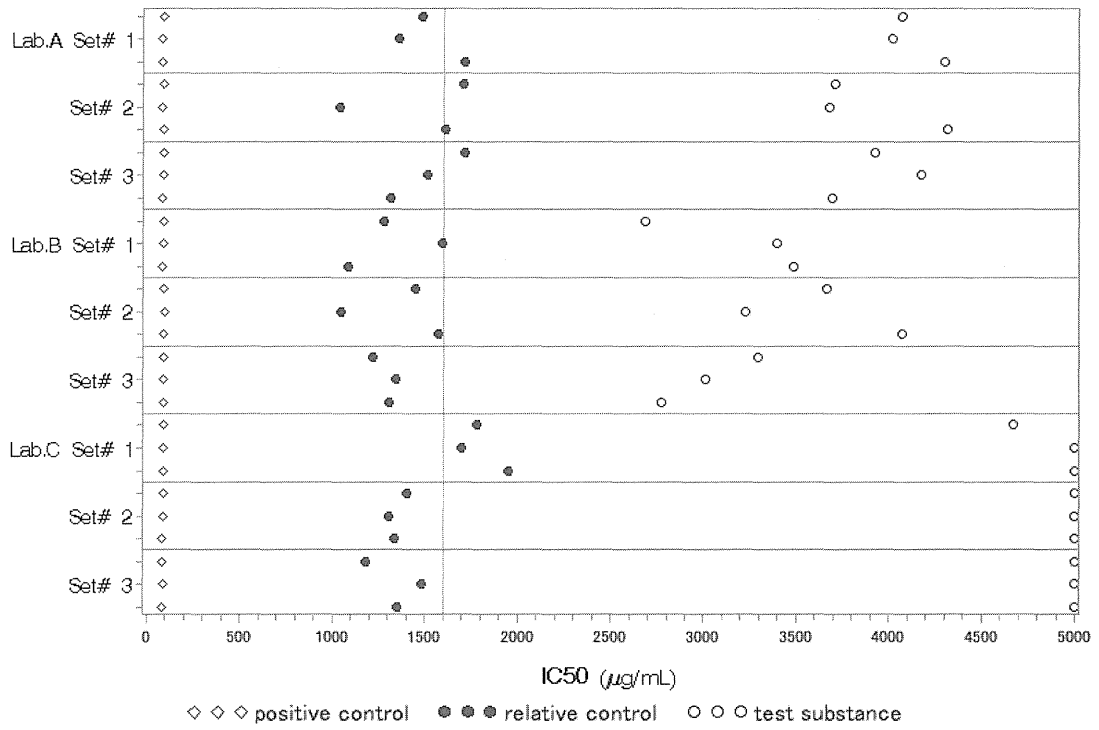


図 3.1.3 物質 03 の IC50

Chemical Code: 04  
SIRC Assay Validation Study Phase 2a

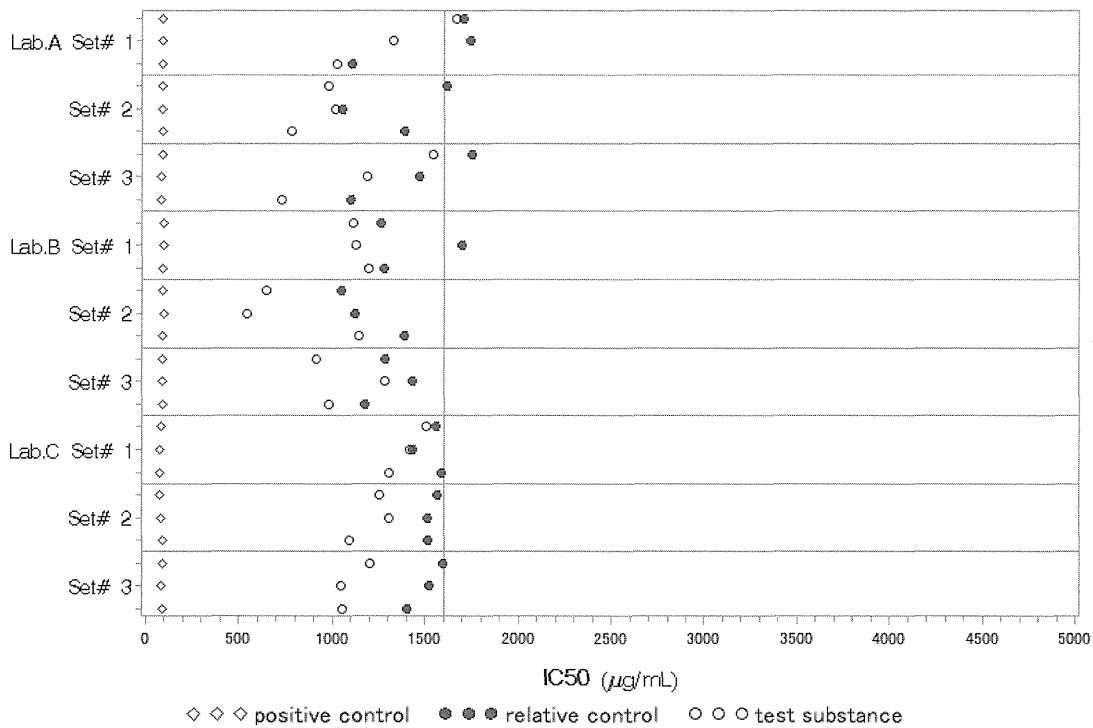


図 3.1.4 物質 04 の IC50

Chemical Code: 05  
SIRC Assay Validation Study Phase 2a

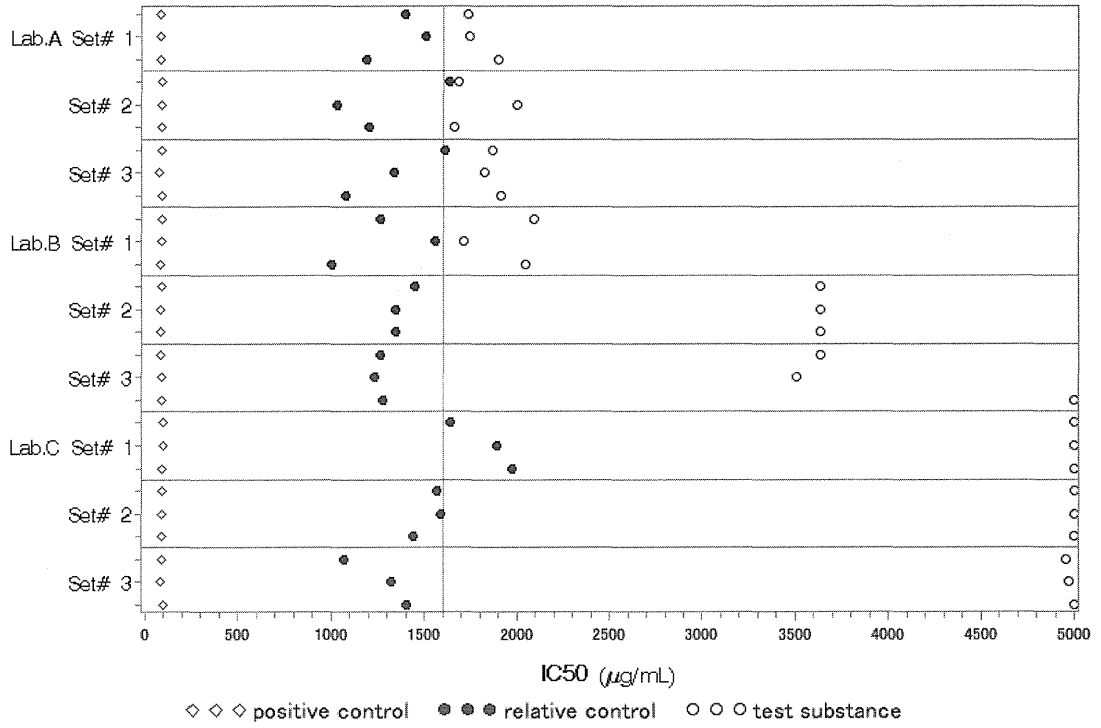


図 3.1.5 物質 05 の IC50

### 3.2 プロトコールに基づく判定結果の施設内再現性

プロトコールに従った判定結果を表 3.2.1 に示す。

表 3.2.1 プロトコールに基づく判定結果

Chemical	Set		Lab.		
	Number	A	B	C	
01	1	Positive	Positive	Positive	Positive
	2	Positive	Positive	Positive	Positive
	3	Positive	Positive	Positive	Positive
02	1	Negative	Negative	Negative	Negative
	2	Negative	Negative	Negative	Negative
	3	Negative	Negative	Negative	Negative
03	1	Negative	Negative	Negative	Negative
	2	Negative	Negative	Negative	Negative
	3	Negative	Negative	Negative	Negative
04	1	Positive	Positive	Positive	Positive
	2	Positive	Positive	Positive	Positive
	3	Positive	Positive	Positive	Positive
05	1	Negative	Negative	Negative	Negative
	2	Negative	Negative	Negative	Negative
	3	Negative	Negative	Negative	Negative

### 3.3 比較対照物質の平均 IC50 の施設内再現性

図 3.3.1 に比較対照物質の平均 IC50 のプロットを、表 3.3.1 にこれらの値を示す。また、表 3.3.1 に各施設ごとの平均 IC50 の平均値と標準偏差を示す。

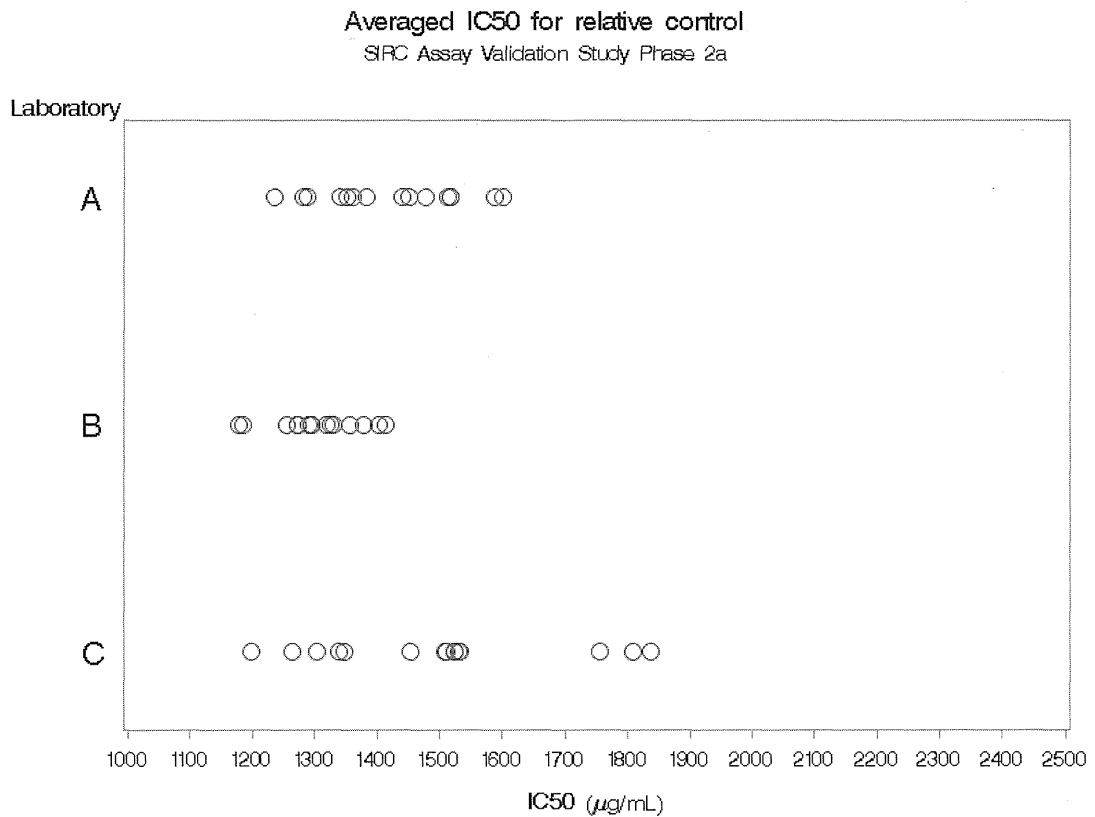


図 3.3.1 比較対照物質の平均 IC50

表 3.3.1 比較対照物質の平均 IC50

A	Lab.		参照	
	B	C	Chemical	Set Number
1478.8	1295.9	1512.2	01	1
1235.6	1327.0	1453.6		2
1589.1	1178.0	1304.2		3
1602.3	1402.4	1755.0	02	1
1281.5	1330.8	1198.7		2
1384.3	1274.0	1525.3		3
1517.0	1320.6	1808.9	03	1
1452.1	1357.8	1348.5		2
1513.4	1290.3	1338.9		3
1518.2	1414.0	1525.1	04	1
1352.4	1184.5	1531.5		2
1440.1	1295.8	1508.1		3
1362.5	1273.8	1837.1	05	1
1288.3	1379.6	1532.1		2
1341.9	1256.4	1264.6		3

表 3.3.2 比較対照物質の平均 IC50 の平均値と標準偏差 (SD)

	N	Mean of Averaged IC50	SD of Averaged IC50
A	15	1423.8	113.4
B	15	1305.4	68.9
C	15	1496.3	191.4

### 3.4 被験物質の平均 IC50 の施設内再現性並びに施設間再現性

図 3.4.1 に被験物質の平均 IC50 のプロットを、表 3.4.1 にこれらの値を示す。また、表 3.4.1 に各施設ごと物質ごとの平均 IC50 の平均値と標準偏差を示す。

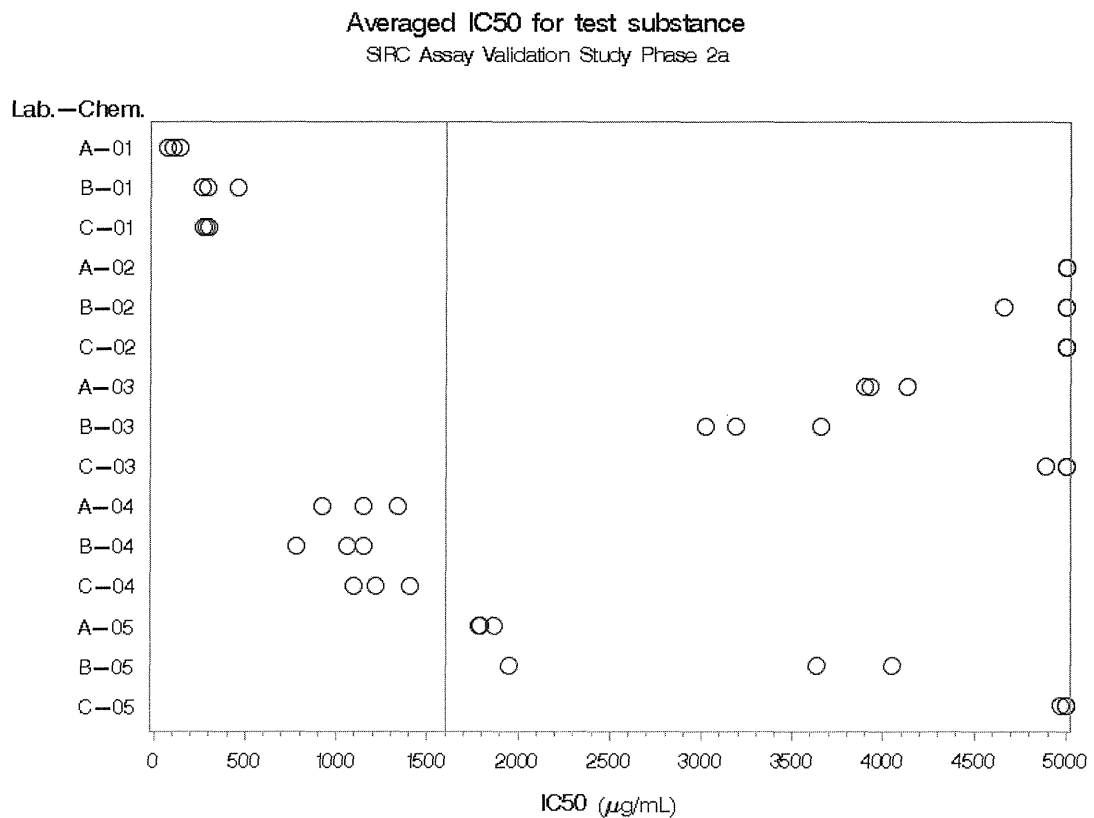


図 3.4.1 被験物質の平均 IC50



表 3.4.1 被験物質の平均 IC50

Chemical	Lab.								
	A Set Number			B Set Number			C Set Number		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
01	141.0	71.7	101.8	288.1	260.2	452.3	298.3	266.6	282.9
02	5000.0	5000.0	5000.0	5000.0	4663.0	5000.0	5000.0	5000.0	5000.0
03	4130.0	3899.0	3931.7	3188.9	3654.8	3025.0	4891.1	5000.0	5000.0
04	1342.3	925.5	1151.9	1147.5	778.5	1061.5	1409.6	1216.4	1099.6
05	1791.6	1783.2	1868.6	1949.6	3630.8	4047.1	5000.0	5000.0	4974.4

表 3.4.2 被験物質の平均 IC50 の平均値と標準偏差 (SD)

Chemical	Lab.	N	Mean of Averaged IC50	SD of Averaged IC50
01	A	3	104.8	34.7
	B	3	333.5	103.8
	C	3	282.6	15.9
02	A	3	5000.0	0.0
	B	3	4887.7	194.6
	C	3	5000.0	0.0
03	A	3	3986.9	125.0
	B	3	3289.6	326.7
	C	3	4963.7	62.9
04	A	3	1139.9	208.6
	B	3	995.8	193.1
	C	3	1241.9	156.6
05	A	3	1814.5	47.1
	B	3	3209.2	1110.5
	C	3	4991.5	14.8

**眼刺激性試験代替法  
SIRC-CVS 細胞毒性試験  
データ解析報告書  
(Version 1.0)**

2013/03/04  
大森崇, 田中裕美

## 目次

1. はじめに.....	3
2. データ解析の方針 .....	4
2.1 解析のためのデータセット .....	4
2.2 実験成立のための基準.....	4
2.3 集計とデータ解析の単位.....	4
2.4 判定.....	4
2.5 データの図示.....	4
2.6 施設内再現性と施設間再現性 .....	5
3.1 物質別各実験の IC50 .....	6
3.2 プロトコールに基づく判定結果の施設内再現性.....	11

## 1. はじめに

SIRC-CVS 細胞毒性試験法は Crystal violet が生細胞の細胞膜に入り込んで染色する性質を利用した試験方法である。この試験法は、眼に対する眼刺激性の評価（刺激の有無）を行う際の代替法として期待されている。

現在、JaCVAM がスポンサーになり、この試験法のバリデーション研究が実施されている。すでに、3 施設による技術移転性の確認を目的とした Phase I 研究が終了している。現在、主に施設内、施設間再現性を検討するための Phase II 研究が 3 施設で実施中である。大規模な Phase II 研究のリスクを避けるため、Phase II 研究は Phase IIa 研究と Phase IIb 研究の 2 つに分けられて実施されている。すでに Phase IIa 研究として、コード化された 5 つの被験物質について、試験を 3 回繰り返すことで再現性を調べる研究が実施された。この検討は被験物質のコード下で、良好な結果であったため、引き続き Phase IIb 研究として、コード化された 15 物質について、同様に 3 回の試験が繰り返される研究が行われた。Phase IIa 研究と IIb 研究の違いは、期間を除くと披見物質の種類と物質数のみが異なり、その他に大きな違いはない。

本稿では、Phase IIb 研究の結果を示す。ここで示す解析の目的は、施設内、施設間の再現性の検討であり、これらが良好だと判断された場合、引き続き実施されることが予定されている Phase III 研究に進むことになっている。Phase III 研究では、最終的な関連性の解析のための研究として、より多くの被験物質を用いた研究で実施予定である。

本報告書は、VMT が Phase IIb 研究の結果を議論するために作成した資料をまとめたものである。このため、被験物質はすべてコード化されたままで記載されている。また、本報告書は VMT で議論を行うためのものであるため、結果に対するいかなる考察も行っていない。