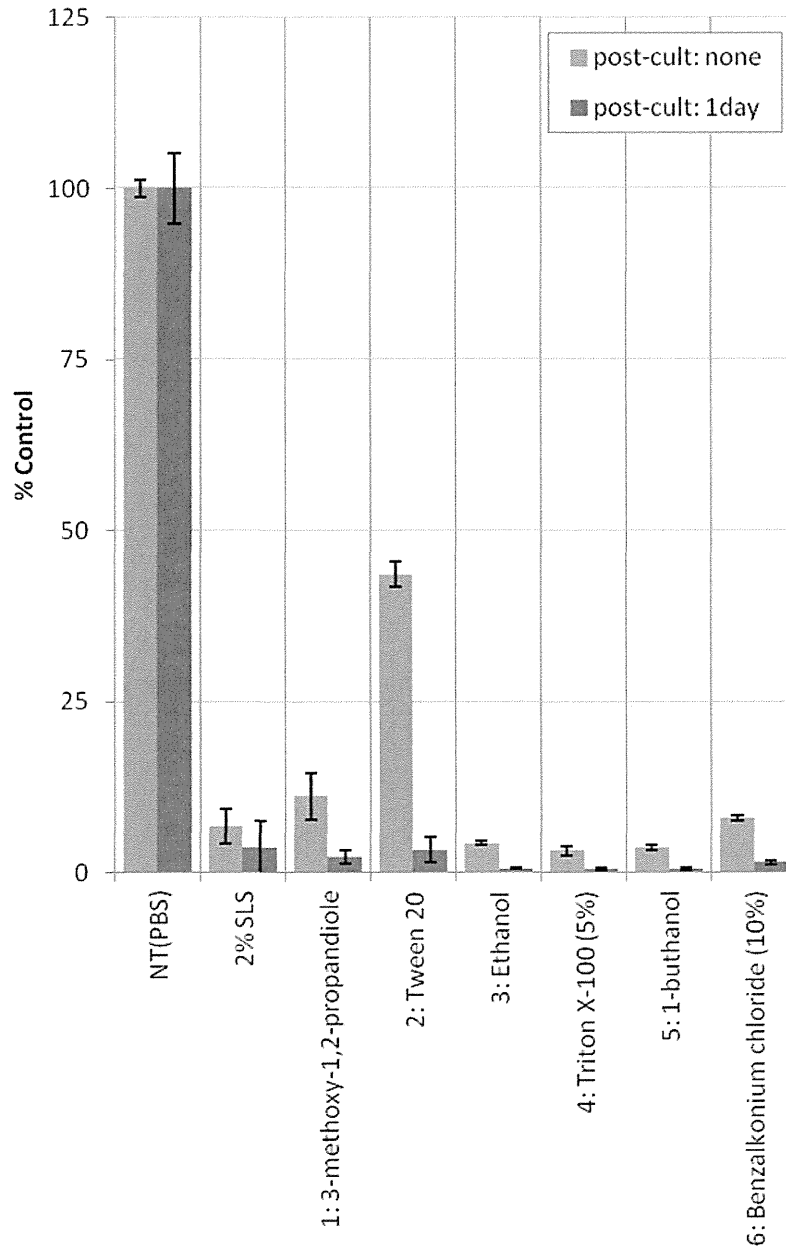


図 4 M. iHCE-NY 三次元角膜再構築モデルを用いた曝露実験

Lot. 201220



分担総合研究報告書

光毒性・光感作性試験代替法に関する諸検討

研究分担者 大野 泰雄 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ROS assay は被験物質の光化学的特性を指標とした光毒性評価ツールである。本評価系は難水溶性薬物への適合性が低いが、この問題を回避するために界面活性剤を加えた micellar ROS assay を構築した。また、本研究では 83 種のモデル化合物を用いて、予測精度ならびに頑健性についても併せて評価を行った。

研究協力者

尾上誠良：静岡県立大学薬学部

A. 研究目的

健康人には何ら皮膚病変を生じないような太陽光が特定の条件下で異常反応を呈することがあり、本症状を光線過敏症 (Photosensitivity) あるいは光毒性反応 (Phototoxicity) と呼ぶ。光線過敏症には内因性ならびに外因性の光毒性反応があり、その臨床像も (i) 光曝露中の発赤, (ii) 遅延型皮膚炎, (iii) 異常な皮膚角質化ならびに細胞の空胞化, (iv) 皮膚の落屑をはじめとして多岐に渡る。外因性光線過敏症の原因となる化合物はこれまでに多く特定されているが、特に一部の抗菌剤（キノロン系、スルホンアミド系、テトラサイクリン系など）、抗ヒスタミン薬、向精神薬、利尿薬、消炎鎮痛薬において顕著な光毒性を認めることがある。このように多くの薬剤で本副作用が認められるため、臨床において服用患者の quality of life 及びコンプライアンスの低下を招く恐れがあり、安全性の観点から

薬剤性光線過敏症リスクを低減することが望まれている。さて、薬剤による光毒性は光刺激性、光遺伝毒性及び光アレルギー性の 3 種に大別され、発症機序の上流では活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の関与が報告されている。この ROS 産生を指標とする ROS assay は *in vitro* 光毒性リスク評価ツールとして高いスループットと予測性を有する。しかし、難水溶性化合物の評価は ROS assay では難しいことが多く、それ故、被験物質の溶解性を改善した新たな評価系が必要となる。そこで Onoue らは界面活性剤を用いた micellar ROS (mROS) assay を新規に構築し、難水溶性薬物への適用性拡大を提案している。一方、本手法による光毒性予測精度や頑健性についてはまだ十分に明らかになっておらず、そこで本研究では多くのモデル化合物を用いて mROS assay の信頼性を検証した。

B. 研究方法

難水溶性薬物として、65 種類の光毒性陽性物質 (Drugs: acridine, acridine HCl,

amiodarone HCl, amlodipine, amlodipine besylate, atorvastatin, benidipine HCl, benzbromarone, bezafibrate, bufexamac, candesartan cilexetil, chlorpromazine HCl, cilnidipine, ciprofloxacin, clofibrate, diclofenac Na, doxycycline HCl, enoxacin, fenofibrate, fluphenazine 2HCl, fluvastatin Na, furosemide, glibenclamide, gliclazide, griseofulvin, hydrochlorothiazide, ibuprofen, levofloxacin, lomefloxacin HCl, losartan K, lovastatin, manidipine HCl, meloxicam, methotrexate, 8-methoxypsoralen, 6-methylcoumarin, mequitazine, nalidixic acid, naproxen, nifedipine HCl, nitrendipine, norfloxacin, ofloxacin, omeprazole, perphenazine, pirfenidone, piroxicam, pitavastatin Ca, pravastatin Na, prochlorperazine dimaleate, promethazine HCl, quinine HCl, rosiglitazone, sparfloxacin, tamoxifen, tetracycline HCl, thioridazine HCl, trifluoperazine, valsartan; Chemicals: anthracene, avobenzone, bithionol, hexachlorophene) と 18 種類の光毒性陰性物質 (Drugs: aspirin, benzocaine, erythromycin, penicillin G, phenytoin, sulisobenzonate; Chemicals: bumetizole, chlorhexidine, cinnamic acid, drometizole, L-histidine, 4-methylbenzylidene camphor, octrizole, octyl methoxycinnamate, octyl salicylate, PABA, SDS, UV-571) を選択した。ROS assay プロトコールに従い、被験物質 (200 μM) と終濃度 0.5% Tween 20 を含む反応液を 96 ウェルプレートに分注して Atlas Suntest CPS series による 1 時間の擬似太陽光照射後 (ca. 2.0 mW/cm^2), ROS (Singlet oxygen と Superoxide) の産生量をそれぞれ測定した。実験は 3 回繰り返し、

各化合物の光毒性リスクを評価した。

(倫理面への配慮)

本研究において動物実験は行なわない。

C. 研究結果

Methotrexate と erythromycin をそれぞれ光毒性陽性ならびに陰性標準物質とし、20 回連続して mROS assay を行った (Fig. 1)。いずれの化合物も 0.5% Tween 20 ミセル溶液に容易に溶解し (終濃度: 200 μM), 2.0 mW/m^2 の照射強度で擬似太陽光を照射した際、methotrexate からは singlet oxygen ($\Delta A_{440\text{ nm}} \cdot 10^3$: 200–240) と superoxide ($\Delta A_{560\text{ nm}} \cdot 10^3$: 880–930) の産生を認め、一方、erythromycin からは極めて限定的な ROS の産生のみが認められた。各測定データから以下の式に従って、singlet oxygen ならびに superoxide 測定における Z'-factor を算出した。

$$Z' = 1 - (3\sigma_{c+} + 3\sigma_{c-}) / |\mu_{c+} - \mu_{c-}|$$

ただし、 σ_{c+} と σ_{c-} はそれぞれ methotrexate と erythromycin の標準偏差であり、 μ_{c+} と μ_{c-} は methotrexate と erythromycin の平均値である。一般に、Z'-factor が 0.5 以上であれば識別性の高い優れた評価系と見なされる。本評価系においては singlet oxygen と superoxide 測定の Z'-factor はそれぞれ 0.58, 0.95 と算出され、すなわち、本評価系は陽性と陰性の差を明瞭に示すことが可能と考えられる。また、methotrexate からの singlet oxygen ならびに superoxide 測定について日内・日間変動係数 (coefficient of variation) を求めたところ、ROS assay ではそれぞれ 9.4%, 3.6% であり、mROS assay ではそれぞれ 9.9%, 2.5% と算出され、いずれの測定法でも優れた精度を認めた。

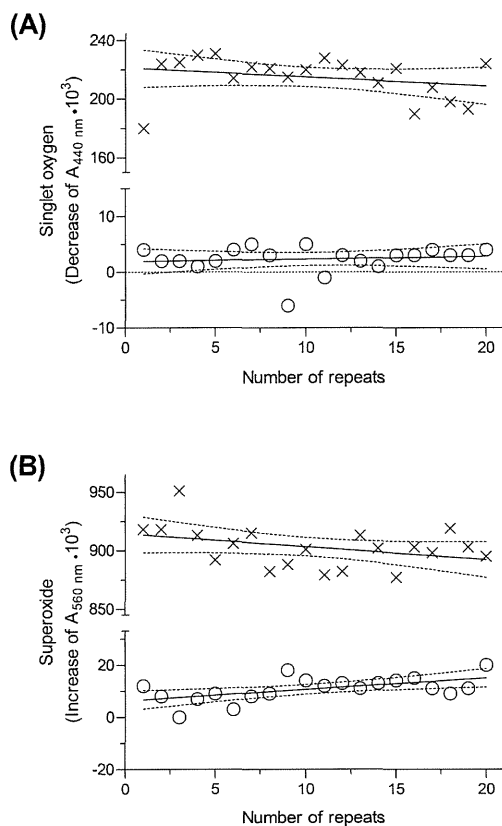


Fig. 1 Multiple measurement of singlet oxygen (A) and superoxide (B) to calculate the Z'-factor for the mROS assay. ×, Methotrexate (200 μM); and ○, erythromycin (200 μM). Solid and dashed lines represent mean and 95% confidence interval, respectively.

次に、モデル化合物 83 種類について ROS assay ならびに mROS assay を実施した (Fig. 2). ROS assay においては、被験物質の溶解度の問題で 83 化合物のうち 23 化合物 (全体の 27.7%) が 200 μM で試験を実施することができなかった。その一方、mROS assay では 2 化合物のみが試験を実施することが出来なかった。すなわち全体の 97.6% が評価可能であった。これは 0.5% Tween 20 ミセルによる溶解補助効果が機能的に働いていることを明確に示唆するものである。先に Onoue らによって提案

された threshold {(i) 25 ($\Delta A_{440 \text{ nm}} \cdot 10^3$) for singlet oxygen, and (ii) 20 ($\Delta A_{560 \text{ nm}} \cdot 10^3$) for superoxide} を用いて各被験物質の光毒性リスクをそれぞれ評価した (Fig. 3A).

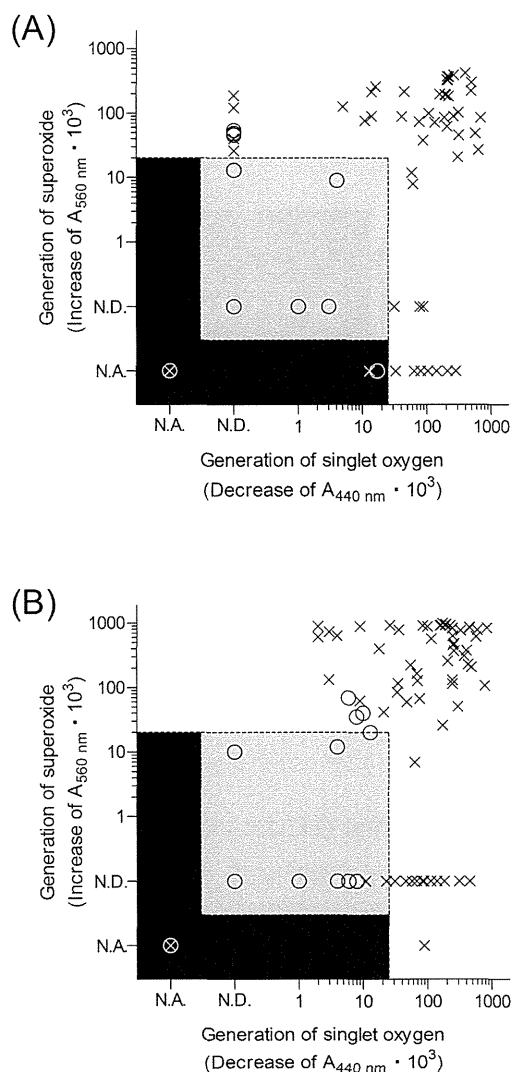


Fig. 2 2D plots of singlet oxygen data versus superoxide data for 83 compounds (200 μM) obtained from ROS (A) and mROS assays (B). ○: Non-phototoxic drugs/chemicals; and ×: phototoxic drugs/chemicals. N.D.: Not detected; and N.A.: not available due to limited solubility. Gray and white regions are indicative of less photoreactive and photoreactive, respectively. The black region indicates that compounds could not be rated due to their poor solubility.

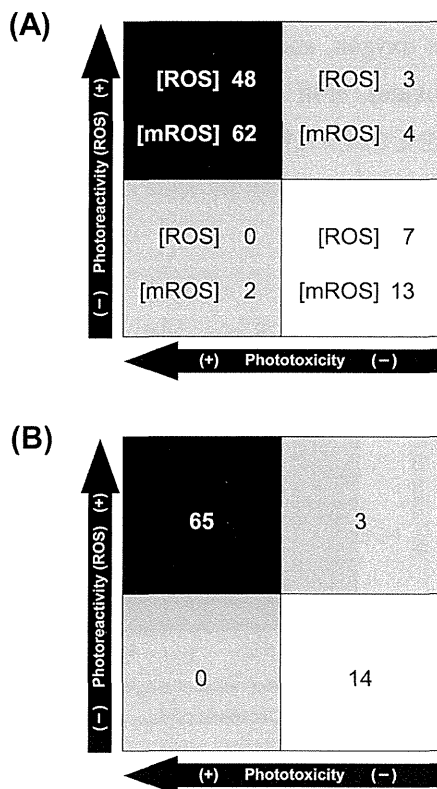


Fig. 3 Positive and negative predictivity of the ROS or mROS assay (A) and strategic combined use (B) as compared to the *in vitro/in vivo* photosafety.

いずれの評価系においても光毒性物質は ROS 産生を示す傾向にあり、一方、陰性化

合物群からの ROS 産生は極めて限定的なものであった。ROS assay では 3 種の化合物で偽陽性判定がなされ、全体的な特異性は 70% であった。ROS assay の陽性ならびに陰性検出能はそれぞれ 94.1%, 100% であった。mROS assay の特異性は 76.5% であり、陽性ならびに陰性検出能はそれぞれ 93.9%, 86.7% であった。ROS assay では偽陰性判定がなかったが、mROS assay では光毒性化合物である ibuprofen と indomethacin が互いに陰性とみなされた。これはミセル添加に伴う光反応性変化の可能性を示唆するものであり、mROS assay は適用範囲が広い反面、その判定には注意を必要とする。

ROS assay は光安全性評価の早期に使用されることが考えられるため、偽陰性を出さないシステムが求められる。そこで ROS assay を一次評価とし、溶解性の問題で評価不可能となった化合物に対して mROS assay を二次的に実施することを考案した (Fig. 4)。この場合、偽陰性を可能な限り抑制しつつ、化合物適合範囲を拡大することが可能と考えられる。このシステムに従っ

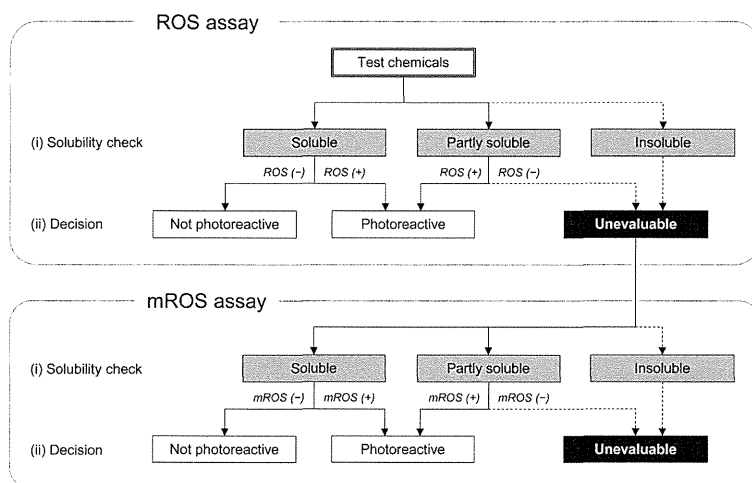


Fig. 4 Schematic representation of proposed photosafety evaluation approach with combined use of ROS and mROS assays.

て 83 種類のモデル化合物を評価したところ、Fig. 3B に示すような結果となった。この方法で評価不可能な化合物は UV-571 の 1 種類のみであり、全体の特異性は 82.4% まで改善した。また、陽性ならびに陰性検出能はそれぞれ 95.6%, 100% と算出され、ROS/mROS assay の互いの欠点を補った有用なアプローチであると考えた。

D. 考察

近年の創薬活動においては水に難溶性の化合物が医薬品候補物質として創出されることが非常に多いが、ROS アッセイにおいては基本的に 200 μ M の濃度でスクリーニングを行うために assay mixture 中での析出を認めることがある。その場合にはより低濃度になるよう希釈を行って ROS アッセイを実施することが可能ではあるが、その際には得られたデータによって陽性判定を出すことはできても陰性判定を出すことがきわめて難しい。しかし、本研究において開発された mROS assay をオプションとして使用することによって難溶性医薬品への適用率が顕著に改善された。ただし、assay buffer の組成を変えた場合には ROS アッセイにおける判定基準が変わる可能性があり、誤った光安全性情報を得ることがないよう細心の注意が必要である。

E. 結論

本結果より、ROS assay と mROS assay を戦略的に実施することによって化合物適用範囲が拡大し、これまでに ROS assay で評価が困難であった化合物の光毒性リスク評価を可能にするものと期待する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Onoue S, Hosoi K, Wakuri S, Iwase Y, Yamamoto T, Matsuoka N, Nakamura K, Toda T, Takagi H, Osaki N, Matsumoto Y, Kawakami S, Seto Y, Kato M, Yamada S, Ohno Y, Kojima H, Establishment and intra-/inter-laboratory validation of a standard protocol of reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation, *J. Appl. Toxicol.*, in press.

2. 学会発表

- 1) Ohno. Y.: Japanese regulation for food safety and role of National Institute of Health Sciences. 1st Pan Asia Conference on Food & Drug Safety Assessment Policies and Regulations in Different Countries I (2011.4.15)
- 2) 大野泰雄：代謝物の安全性評価と FDA 及び ICH の指針について。第 37 回日本トキシコロジー学会シンポジウム (2010. 6)
- 3) 大野泰雄：「動物の愛護及び管理に関する法律」(動愛法) の改定に向けて。日本動物実験代替法学会 第 23 回大会シンポジウムのオーガナイズ (2010. 12)
- 4) 大野泰雄：薬理学における動物実験代替法研究の重要性、日本薬理学会 (2010. 3.)
- 5) 大野泰雄：ICH M3(R2)ガイドラインへの経緯、日本毒性学会(2011,7.13)
- 6) 大野泰雄：レギュラトリーサイエンスと国立衛研、名古屋市立大学大学院薬学研究科医薬品質保証学分野・医薬品安全性評価学分野発足公開シンポジウム (2011.7.16)

- 7) 大野泰雄：医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期とヒト初回投与について、国立精神・神経センター (2011.7.22)
- 8) 大野泰雄：MD試験および探索的INDをめぐる最近の国際的動向、APDDシンポジウム(2011.12.16)
- 9) 大野泰雄：安全性評価における動物実験とin vitro代替法の利点および問題点、その現状について、東京都健康安全研究センター技術懇話会(111208)
- 10) Yasuo Ohno: Reliability of Data for New Drug Application in Japan – Non-GLP Tests –, Global Quality Assurance Conference (2011.11.15)
- 11) Mariko Sugiyama: Current Status on Animal Alternatives in Japan, The First International Symposium on Cosmetics -Alternatives to Animal Experimentation for Cosmetics -, 2011.
- 12) 大野泰雄, 秋田正治, 今井教安, 大森崇, 岡本裕子, 奥村秀信, 河野有希, 杉山真理子, 萩野滋延, : 24時間閉塞による皮膚刺激性試験の代替法開発のための被験物質リストの作成, 第24回日本動物実験代替法学会, 2011.
- 13) 大野泰雄, 高橋光一, 小林章男, 池田孝則, 日原太郎：早期臨床試験に関する最近の話題、非臨床データの臨床試験への外挿(バイオマーカー)、第33回日本臨床薬理学会学術総会 (2012.11)
- 14) 大野泰雄: 眼刺激性試験代替法のバリデーション{バリデーション事始め}、日本動物実験代替法学会25周年記念講演会(2012.12)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担総合研究報告書

活性酸素種産生能を指標とした光毒性リスク評価方法に関する研究

研究分担者 尾上 誠良 静岡県立大学 薬学部

研究要旨

薬剤性光線過敏症は近年注目を集める副作用の一つであり、その回避のために効果的な予測方法の開発が急務の課題となっている。本研究では光化学的試験方法である ROS アッセイの信頼性ならびに頑健性を精査するため、多施設バリデーションスタディを実施した。

A. 研究目的

薬剤性光線過敏症はその投与方法にかかわらず薬剤摂取後、露光により引き起こされる副作用である。オゾン層破壊によって地表に到達可能な UV 照射量増加に伴い、本副作用はより強く注目されるようになってきた。また、創薬段階における本副作用リスクの回避が強く望まれており、これまでも多くの *in vitro* ならびに *in vivo* 評価方法が開発されている。*In vitro* 評価法として UV 吸収測定が広く実施されているが、より実質的な光化学的反応性を評価するために我々は reactive oxygen species (ROS) assay を開発した。本試験法は被験物質を光照射する際に発生する ROS 量をモニタリングすることを特徴とする光化学反応性評価法であり、種々のモデル化合物を用いた検討において薬剤性光線過敏症リスクを予測出来る可能性を示唆した。本研究では ROS assay の有用性を検証するために 2 種類の solar simulator (Atlas Suntest CPS plus, Seric SXL-2500V2) を用いて多施設バリデーションスタディを行い、その

transferability ならびに信頼性を精査した。

B. 研究方法

日本動物実験代替法検証センター (JaCVAM) 主催のバリデーション運営委員会 (VMT) の下、ROS assay プロトコルを確立した。Dr. Manfred Liebsch (International Centre for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments, ZEBET), Europe Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), and Korean Center for the Validation of Alternative Methods (KoCVAM) の協力の下、VMT 主導で化合物選択を実施し、最終的に 2 種の標準物質 (quinine, sulisobenzon), 23 種の光毒性陽性化合物 (acridine, acridine HCl, amiodarone HCl, chlorpromazine HCl, doxycycline HCl, fenofibrate, furosemide, ketoprofen, 6-methylcoumarine, 8-methoxy psoralen, nalidixic acid, nalidixic acid Na, norfloxacin, ofloxacin, piroxicam,

promethazine HCl, rosiglitazone, tetracycline, anthracene, avobenzene, bithionol, hexachlorophene, rose bengal) ならびに 19 種の光毒性陰性化合物 (aspirin, benzocaine, erythromycin, phenytoin, penicillin G, bumetizole, camphor sulfonic acid, chlorhexidine, cinnamic acid, drometizole, histidine, methylbenzylidene camphor, octrizole, octyl methacrylate, octyl methoxycinnamate, octyl salicylate, PABA, SDS, UV-571) を選定した. バリデーションスタディには Atlas Suntest CPS series を有する 3 施設 (Lab#1-3) と Seric SXL-2500 を有する 4 施設 (Lab#4-7) が参加し, GLP の精神にのっとり各種検討を実施した. ROS assay プロトコールに従い, コード化された 42 種類の被験物質 (200 μ M) を含む反応液を 96 ウェルプレートに分注して Atlas Suntest CPS series による 1 時間の擬似太陽光照射後 (ca. 2.0 mW/cm^2), ROS (Singlet oxygen と Superoxide) の産生量をそれぞれ測定した. 実験は 3 回繰り返し, 各化合物の光毒性リスクを評価した.

(倫理面への配慮)

本研究において動物実験は発生しない.

C. 研究結果

Atlas Suntest CPS plus ならびに Seric SXL-2500V2 からの放射光は共に地球に到達する太陽光のスペクトルと良い対応を示した(Fig. 1). 照射強度を適切に調整するという前提のもとで, 両 solar simulator は擬似太陽光の適切な光源として使用することが出来るものと考えた. しかし, おそらくは UV フィルターの影響から, UVB 領域における僅かな差を認めた.

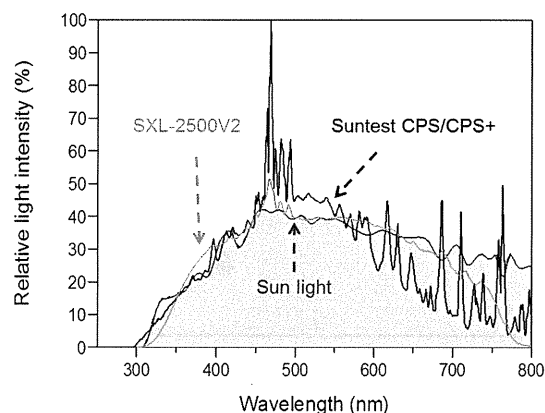


Fig. 1 Spectral patterns of sunlight and emitted light from Atlas Suntest CPS plus and Seric SXL-2500V2.

陽性標準物質 quinine と陰性標準物質 sulisobenzone を対象に, Atlas Suntest CPS series ならびに Seric SXL-2500V2 を用いて ROS assay を実施した (Table 1). Atlas Suntest CPS series を利用した Lab#1-3 における singlet oxygen の日内変動係数 (CV) は 1.5-2.1% の範囲であり, superoxide の CV は 2.6-7.4% 程度であった. 一方, Seric SXL-2500V2 を用いた Lab#4-7 における CV は singlet oxygen で 3.3-6.2%, superoxide で 1.7-9.4% であった. 日間変動係数についても両装置使用グループ間において大きな差を認めなかった. また, いずれの疑似太陽光を使用しても, 光毒性陰性標準物質である sulisobenzone からの ROS 産生は極めて小さいか, あるいは検出不能であった. 施設間の再現性については, quinine の singlet oxygen で CV が 15.4% (Lab#4-7), 13.2% (Lab#4-7) であり, superoxide では 17.0% (Lab#1-3), 7.1% (Lab#4-7) であった. すなわち, 両光源使用下において ROS data は顕著な差を認めず, 良好な施設間再現性を示した.

Table 1 Intra- and inter-laboratory precision of ROS assay

	Generation of reactive oxygen species, Mean±SD (CV, %)					
	Singlet oxygen (Decrease of A _{440 nm} × 10 ³)			Superoxide (Increase of A _{560 nm} × 10 ³)		
	Lab#1	Lab#2	Lab#3	Lab#1	Lab#2	Lab#3
Intra-laboratory (n=9)						
<i>Intra-day</i>						
Quinine	366±8 (2.1)	429±7 (1.5)	531±10 (1.8)	306±23 (7.4)	291±16 (5.3)	403±10 (2.6)
Sulisobenzone	-2±2	1±3	5±6	-5±1	-15±1	-17±3
<i>Inter-day</i>						
Quinine	367±12 (3.3)	429±7 (1.7)	534±19 (3.5)	310±21 (6.9)	278±26 (9.3)	399±10 (2.5)
Sulisobenzone	-2±2	1±3	-1±3	-6±1	-13±4	-12±2
Inter-laboratory (n=9)						
Quinine		442±68 (15.4)			330±56 (17.0)	
Sulisobenzone		1±4			-12±5	

	Generation of reactive oxygen species, Mean±SD (CV, %)							
	Singlet oxygen (Decrease of A _{440 nm} × 10 ³)				Superoxide (Increase of A _{560 nm} × 10 ³)			
	Lab#4	Lab#5	Lab#6	Lab#7	Lab#4	Lab#5	Lab#6	Lab#7
Intra-laboratory (n=9)								
<i>Intra-day</i>								
Quinine	478±16 (3.3)	508±31 (6.2)	389±21 (5.5)	447±15 (3.3)	259±4 (1.7)	258±9 (3.5)	272±10 (3.8)	281±26 (9.4)
Sulisobenzone	0±4	2±9	1±1	2±4	-6±1	-3±5	-7±0	-5±3
<i>Inter-day</i>								
Quinine	475±17 (3.5)	537±27 (5.0)	383±21 (5.5)	439±12 (2.7)	246±1 (4.5)	261±8 (3.1)	277±13 (4.6)	287±20 (6.9)
Sulisobenzone	-2±2	3±8	2±1	1±3	-6±1	-5±1	-7±0	-2±2
Inter-laboratory (n=12)								
Quinine		459±60 (13.2)				268±19 (7.1)		
Sulisobenzone		1±3				-5±2		

Lab#1-3: Atlas Suntest CPS series; and Lab4-7: Seric SXL-2500V2. Data represent mean ± SD of three repeated experiments for intra-day (n=9) precision and inter-day precision (n=9). Values in parentheses are coefficients of variation (%).

また、選定した 42 化合物の被験物質についても各施設で併せて ROS assay を実施した。ROS assay の sensitivity は全施設において 100% であり、specificity は 41.7–81.8% (Lab#1–3), 46.2–63.6% (Lab#4–7) であった。光毒性陰性物質の positive predictivity は、施設により 75.9–91.7% (Lab#1–3), 75.0–84.0% (Lab#4–7) と異なるものの、いずれの施設においても偽陰性予測を認めず難溶性のため評価不能であった

被験物質を除き、光毒性物質の negative predictivity は全施設とも 100% であった (Table 2).

Atlas Suntest CPS series, Seric SXL-2500V2 を用いたバリデーション試験双方において、溶解度の問題で希釈を余儀なくされるケースや、評価そのものが出来ない被験物質が存在した。また、rose bengal は 559 nm 付近に極大吸収 (90,400 M⁻¹cm⁻¹) を持つため、測定上の干渉が起こって superoxide の測定

は不可能であった。これらのケースを除き、ROS assay と *in vitro/in vivo* 光毒性所見の間には良い関連性を示し、光安全性評価における初期スクリーニング法としての有用性を示唆した。今後さらなるデータの蓄積によって、適用限界に関するより詳細な情

報が集まり、適切な使用方法に関する知見が得られることを期待する。

D. 考察

Atlas Suntest CPS series ならびに Seric SXL-2500V2 を用いた ROS assay の多施設

Table 2 Outcomes from ROS assay

Chemical	Phototoxicity			ROS (Lab No.)						
	3T3	Animal	Human	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
Phototoxic drugs										
Acridine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acridine HCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amiodarone HCl	+	+	+	+	+					
Chlorpromazine HCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Doxycycline HCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenofibrate	+	ND	+	+		+	+	+	+	
Furosemide	+/-	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
Ketoprofen	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
6-methylcoumarine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8-Methoxy psoralen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nalidixic acid free-acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nalidixic acid Na	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Norfloracin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ofloxacin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Piroxicam	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Promethazine HCl	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
Rosiglitazone	+	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+
Tetracycline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phototoxic chemicals										
Anthracene	+	+	+			+				+
Avobenzone	+	-	+	+	+	+	+	+		+
Bithionol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hexachlorophene	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Rose Bengal	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Non-phototoxic drugs										
Aspirin	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-
Benzocaine	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-
Erythromycin	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-
Phenytoin	-	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+
Penicilin G	-	ND	ND	-	+	+	+	+	+	-
Non-phototoxic chemicals										
Bumetrizole	-	ND	ND							
Camphor sulfonic acid	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-
Chlorhexidine	-	ND	-	-	-	+	-	+	-	+
Cinnamic acid	-	ND	ND	-	+	+	-	+	+	-
Drometrizole	-	ND	ND							
L-histidine	-	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+
Methylbenzylidene camphor	-	-	-				+			
Octrizole	-	ND	ND			+				+
Octyl methacrylate	-	ND	ND			+				
Octyl methoxycinnamate	-	-	-				+	+		
Octyl salicylate	-	-	-					+		
PABA	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-
SDS	-	ND	ND	-			+	-		
UV-571	-	ND	ND							

+: positive, -: negative, |: inconclusive, ND: no data

バリデーションスタディの結果, ROS assay は高い transferability と predictive capacity を示した. しかしながら, 幾つかの擬陽性を認めたことと, 溶解性の低い化合物の評価に関する問題が提示され, 今後の改良が望まれるところである. 特に化合物の溶解性に関する問題点は, 現在の創薬において創製される候補化合物の大半が難水溶性であることを考慮すれば解決すべき課題の一つであり, 何らかの方策が必要と考える.

E. 結論

本結果より, ROSアッセイは光化学的反応性を指標として光毒性リスクを予測するツールとしてその有用性が期待できる. また, 使用する solar simulator が異なっても, 適切にキャリブレーションすることによって信頼性の高い光安全性評価に用いることができるものと考えられる.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Onoue S, Seto Y, Kato M, Aoki Y, Kojo Y, Yamada S, Inhalable Powder Formulation of Pirfenidone with Reduced Phototoxic Risk for Treatment of Pulmonary Fibrosis. *Pharm. Res.*, in press.
- 2) Seto Y, Inoue R, Kato M, Yamada S, Onoue S, Photosafety assessments on pirfenidone: Photochemical, photobiological, and pharmacokinetic characterization. *J. Photochem. Photobiol. B*, in press.
- 3) Onoue S, Kato M, Yamada S, Development of an albuminous reactive oxygen species assay for photosafety evaluation under experimental biomimetic conditions. *J. Appl. Toxicol.*, in press.
- 4) Onoue S, Hosoi K, Wakuri S, Iwase Y, Yamamoto T, Matsuoka N, Nakamura K, Toda T, Takagi H, Osaki N, Matsumoto Y, Kawakami S, Seto Y, Kato M, Yamada S, Ohno Y, Kojima H, Establishment and intra-/inter-laboratory validation of a standard protocol of reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation, *J. Appl. Toxicol.*, in press.
- 5) Seto Y, Hosoi K, Takagi H, Nakamura K, Kojima H, Yamada S, Onoue S, Exploratory and regulatory assessments on photosafety of new drug entities, *Current Drug Safety*, **7 (2)**: 140–8 (2012)
- 6) Satomi Onoue, Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Ryo Inoue, Hideyuki Ito, Tsutomu Hatano, Shizuo Yamada: In vitro photochemical and phototoxicological characterization of major constituents in St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) extracts. *Phytochemistry*, **72**, 1814-20 (2011)
- 7) Yoshiki Seto, Ryo Inoue, Masanori Ochi, Graham Gandy, Shizuo Yamada, Satomi Onoue: Combined use of in vitro phototoxic assessments and cassette dosing pharmacokinetic study for phototoxicity characterization of fluoroquinolones. *AAPS J.*, **13**, 482-492 (2011)

- 8) Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Naoko Igarashi, Ryo Inoue, Ami Oishi, Toshihiko Toida, Shizuo Yamada, Satomi Onoue: In vitro photobiochemical characterization of sulfobutylether- β -cyclodextrin formulation of bufexamac. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **55**, 591-596 (2011)
- 9) 尾上 誠良 : 創薬過程における薬剤性光線過敏症の予測. *臨床免疫・アレルギー科*, **566**, 546-550 (2011)
- 10) Onoue, S., Takahashi, H., Kawabata, Y., Seto, Y., Hatanaka, J., Timmermann, B., Yamada, S.: Formulation design and photochemical studies on nanocrystal solid dispersion of curcumin with improved oral bioavailability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **99**: 1871-1881 (2010).
- 11) Kawabata, Y., Yamamoto, K., Debari, K., Onoue, S., Yamada, S.: Novel crystalline solid dispersion of tranilast with high photostability and improved oral bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **39**: 256-262 (2010).
- 12) Onoue, S., Ochi, M., Gandy, G., Seto, Y., Igarashi, N., Yamauchi, Y., Yamada, S.: High-throughput screening system for identifying phototoxic potential of drug candidates based on derivatives of reactive oxygen metabolites. *Pharmaceutical Research*, **27**: 1610-1619 (2010)
- 13) Seto, Y., Ochi, M., Onoue, S., Yamada, S.: High-throughput screening strategy for photogenotoxic potential of pharmaceutical substances using fluorescent intercalating dye. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **52**: 781-786 (2010)
- 14) Seto, Y., Ochi, M., Igarashi, N., Inoue, R., Oishi, A., Toida, T., Yamada, S., Onoue, S.: In Vitro Photobiochemical Characterization of Sulfobutylether-beta-cyclodextrin Formulation of Bufexamac. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **55**: 591-596 (2011)
- 15) 尾上 誠良「最前線：薬剤性光線過敏症」*ファルマシア* (日本薬学会), **47**: 295-300.

2. 学会発表

- 1) 尾上 誠良, 細井 一弘, 若栗 忍, 岩瀬 由美子, 山本 敏誠, 松岡 奈央子, 中村 和希, 戸田 嗣人, 高木 広憲, 大崎 尚人, 松本 康浩, 世戸 孝樹, 加藤 尚視, 山田 静雄, 大野 泰雄, 島 肇: ROS アッセイ多施設バリデーション: 物性からの光毒性リスク予測を目指して. 日本薬剤学会 第 27 年会 (神戸), 要旨集 p.213, 2012 年 5 月 24-26 日
- 2) 加藤尚視, 井上僚, 世戸孝樹, 尾上誠良, 山田静雄: Phenothiazine 誘導体をモデル薬物とした高効率光線過敏症リスク評価法の提案. 日本薬剤学会 第 27 年会 (神戸), 要旨集 p.155, 2012 年 5 月 24-26 日
- 3) 尾上 誠良: 薬剤性光線過敏症リスク低減を指向した Pirfenidone 粉末吸入製剤. 第 15 回 間質性肺炎細胞分子病態研究会 (東京), 2012 年 8 月 17 日-18 日
- 4) 松本 康浩, 尾上 誠良, 細井 一弘, 若栗 忍, 岩瀬 裕美子, 山本 敏誠, 松岡 奈央子, 中村 和希, 戸田 嗣人, 高木 広憲, 大崎 尚人, 川上 哲, 世戸 孝樹,

- 加藤 尚視, 山田 静雄, 大野 泰雄, 小島 肇: 光安全性評価のための ROS アッセイ多施設バリデーション. 第 39 回日本毒性学会学術年会 (仙台), 要旨集 p 258, 2012 年 7 月 17 日-19 日
- 5) Satomi Onoue, Yoshiki Seto, Ryo Inoue, Masashi Kato, Yosuke Aoki, Yoshiki Kojo, Shizuo Yamada: Respirable Powder Formulation of Pirfenidone with Reduced Phototoxic Risk. The 2012 AAPS Annual Meeting and Exposition. (Chicago, US), Oct 14-18, 2011
 - 6) Masashi Kato, Ryo Inoue, Yoshiki Seto, Satomi Onoue, Shizuo Yamada: Strategic phototoxic risk assessment on phenothiazine derivatives based on photochemical and pharmacokinetic properties. 27th JSSX Annual Meeting (Chiba), Abstr. P.237, Nov 20-22, 2012
 - 7) 加藤 尚視, 井上 僚, 世戸 孝樹, 尾上 誠良, 山田 静雄: フェノチアジン誘導体をモデル薬物とした高効率光毒性リスク評価. 日本動物実験代替法学会 第 25 回大会 (東京) 要旨集, p. 165, 2012 年 12 月 7-9 日
 - 8) 岩瀬 由美子, 山本 敏誠, 若栗 忍, 尾上 誠良, 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-日本動物実験代替法学会 第 25 回大会 (東京) 要旨集, p. 167, 2012 年 12 月 7-9 日
 - 9) 鈴木 源, 加藤 尚視, 尾上 誠良, 山田 静雄: 光毒性リスク評価のための改良型 ROS assay の開発. 日本動物実験代替法学会 第 25 回大会 (東京) 要旨集, p. 195, 2012 年 12 月 7-9 日
 - 10) 井上 僚, 世戸 孝樹, 越智 幹記, 尾上 誠良, 山田 静雄: 光毒性リスク回避を指向した bufexamac の Cyclodextrin 製剤開発. 日本薬学会 第 131 年会 (静岡), 要旨集 (4)p.246, 2011 年 3 月 29 日
 - 11) 世戸 孝樹, 井上 僚, 越智 幹記, Gandy Graham, 尾上 誠良, 山田 静雄: 創薬支援のための薬剤性光線過敏症リスク評価に関する薬剤科学的研究 (9)-スループット向上を指向した光毒性評価のためのスクリーニング系の開発-. 日本薬学会 第 131 年会 (静岡), 要旨集 (4)p.186, 2011 年 3 月 30 日
 - 12) 尾上 誠良: 創薬過程における薬剤性光線過敏症の予測. 第 23 回アレルギー学会春期臨床大会, 要旨集 p.45, 2011 年 5 月 14 日
 - 13) 世戸 孝樹, 井上 僚, 越智 幹記, 尾上 誠良, 山田 静雄: Bufexamac の光感受性低減を指向した cyclodextrin 製剤の開発. 日本薬剤学会第 26 年会 (東京), 要旨集 p.189, 2011 年 5 月 31 日
 - 14) 世戸 孝樹, 井上 僚, 越智 幹記, Gandy Graham, 尾上 誠良, 山田 静雄: 創薬支援のための薬剤性光線過敏症リスク評価に関する薬剤科学的研究 (10) -皮膚移行性評価のスループット向上を指向したリスク評価系の構築-. 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 (横浜), 要旨集 p.136, 2011 年 7 月 11 日~13 日
 - 15) Yoshiki Seto, Yosuke Aoki, Ryo Inoue, Yoshiki Kojo, Masashi Kato, Masanori Ochi, Satomi Onoue, Shizuo Yamada: Developing respirable powder formulation of pirfenidone for reduced phototoxic risk. 26th JSSX Annual Meeting in Hiroshima. (Hiroshima). Abstr. P.256. Nov17, 2011
 - 16) 世戸孝樹, 越智幹記, 尾上誠良, 山田静雄: 創薬支援のための光線過敏症リスク評価に関する薬剤科学的研究 (8) -新規 in vitro 光遺伝毒性リスク評価ツールの開発-, 日本薬剤学会第 25 年会 (徳島), 要旨集 p.233, 2010 年 5 月 14 日
 - 17) Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Tyo Inoue, Gandy Graham, Satomi Onoue and Shizuo Yamada: Combined use of photobiochemical and cassette dosing pharmacokinetic data for predicting phototoxic potential of pharmaceutical chemicals., 25th JSSX Annual Meeting in Tokyo. (Tokyo), Abstr. P.238, Oct7-9, 2010

- 18) Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Hideyuki Ito, Tsutomu Hatano, Satomi Onoue and Shizuo Yamada: Safety assessments on nutraceuticals: Phototoxic potential of St. John's Wort. 3rd International Conference on Health and Longevity Sciences. (Shizuoka), Abstr. p. 34, Oct 16, 2010
- 19) Yoshiki Seto, Masanori Ochi, Gandy Graham, Satomi Onoue, and Shizuo Yamada: New screening strategy for predicting in vivo phototoxic risk of fluoroquinolones using photobiochemical and cassette dosing pharmacokinetic data, FIP PSWC 2010/AAPS Annual Meeting and Exposition (New Orleans, US), Nov 14-18, 2010
- 20) 井上僚、世戸孝樹、越智幹記、尾上誠良、山田静雄： 光毒性リスク回避を指向した Bufexamac のサイクロデキストリン製剤開発，日本薬学会東海支部例会（静岡），講演要旨集 p.93, 2010年11月28日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担総合研究報告書

皮膚刺激性および眼刺激性試験代替法のバリデーションに関する研究

研究分担者 小島 肇
国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

皮膚刺激性試験代替法として、培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた試験法のバリデーションを実施し、バリデーション報告書 OECD 事務局に提出した。その報告書に対する OECD の第三者評価の指示に従い、バラツキを少なくする試験法の改良を行い、追加バリデーションを実施し、この報告書を OECD に再提出した。眼刺激性試験代替法として、短時間暴露 (STE) 法のバリデーションを実施し、バリデーション報告書を OECD 事務局に提出した。眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS アッセイについては、国際バリデーション実行委員会を組織し、phase I ~ II のバリデーションを実施し、高い施設内および施設間再現性を確認できた。また、3次元角膜モデル LabCyte CORNEA-MODEL24 を用いた眼刺激性試験代替法のプロトコルを検証するため、共同研究を実施し、プロトコルの問題点を確認できた。

キーワード：皮膚刺激性試験、眼刺激性試験、バリデーション、動物実験代替法

研究分担者及び研究協力者の氏名・所属機関名及び所属機関における職名

大森 崇 同志社大学文化情報学部
准教授

研究分担者

小島 肇 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 新規試験法評価室
室長

研究協力者
加藤雅一

ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (J-TEC) 株式会社
研究開発部 ラボサイト
クラスター 主幹研究員

林 和彦

花王株式会社 安全性評価
研究所 研究員

坂口 斉

花王株式会社 安全性評価
研究所 上席主任研究員

簾内桃子

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 主任研究員

A. 研究目的

2008-2009 年に掛け、ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (J-TEC) 株式会社製の培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法の有用性を検証するため¹⁾、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会が皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究を実施した。このバリデーション研究を通して、目的であった LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験で得られる皮膚刺激性の判定が複数の施設間でどの程度一致するか (施設間再現性)、ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) で認証されている EPISKIN で得られた判定結果とどの程度一致するか (同等性)。動物実験結果とどの程度一致するか (代替可能性) という 3 つの課題への解答を、多施設での

実験を通して満たすことができた。

この試験法の第三者評価が OECD 第三者評価委員会において実施され、その結果として、1-bromohexane の偽陰性等の結果により、本モデルを用いた皮膚刺激性評価は不十分と判断された。そこで、製造元である J-TEC において試験法の見直しが行われ、プロトコルの改良がなされた。この改良はプロトコルにとって重要な問題であると JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) 運営委員会が判断したことから、厚生労働科学研究の支援を受け、この改良点を盛り込んだ改訂プロトコルを用いたバリデーション研究を実施することになった。

一方、短時間曝露試験 STE (Short Time Exposure) 法は、ウサギ角膜由来の SIRC 細胞に被験物質を一定濃度、5 分間曝露した際の細胞生存率をエンドポイントとした簡便な眼刺激性試験代替法である。2008-2009 年に、日本動物実験代替法学会において、STE 試験の技術易習得性、施設間再現性と代替可能性を評価するため、5 施設によるバリデーション研究が実施され、高い技術易習得性が確認された。さらに、コード化された 25 被験物質によるバリデーションが実施され、良い施設間再現性が確認された。本研究では、先回のバリデーション研究と合わせて被験物質の GHS 区分のバランスが最適になるように、主に Category2 の物質から選択したより多くの被験物質を用いて、先回のバリデーションに参加した 3 施設の協力を得て、代替可能性の再評価を目的とした。

また、眼刺激性試験代替法 SIRC-CVS アッセイは、ウサギ角膜由来の SIRC 細胞に被験物質を種々の濃度で 72 時間曝露した際の細胞生存率をエンドポイントとした簡便な眼刺激性試験代替法である。本試験法は、資生堂で開発され⁷⁾、1990 年代には厚生労働科学研究 (大野班) でバリデーションされた方法を⁸⁾、資生堂が改良したものである⁹⁾。2010-2011 年に、JaCVAM 眼刺激性評価委員会が評価され、バリデーションが必要と判断された。そこで、JaCVAM が、化粧品・医薬部外品の許認可に必要な眼刺激性の情報を得られる代替試験法として SIRC アッセイの再現性、予測性をバリデーションで確認することを目的として、3 施設によるバリデーション研究が実施されることになった。

さらに、J-TEC 株式会社によって開発された 3 次元培養角膜モデル LabCyte

CORNEA-MODEL24 を用いる眼刺激性試験代替法である⁴⁾。バリデーションの前段階として、J-TEC で開発されたプロトコルの技術移転性を他施設で検証するための共同研究を、24 施設 (J-TEC を含む) の協力を得て実施した。

B. 研究方法

B-1) 培養表皮モデル (LabCyte EPI-MODEL24) の phase IV バリデーション

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method 内の²⁾ performance standard に記載されている 20 物質をコード化して参加 3 施設に配布し、改訂プロトコルを用いたバリデーションを実施した。

B-1-1) バリデーション実行委員会

委員長：小島 肇 (国立衛研)、
委員：加藤雅一 (J-TEC)、大森 崇 (同志社大学)

B-1-2) 参加施設

小林製薬株式会社、ファンケル、DSTC (薬物安全性試験センター)

B-1-3) トレーニング

2010 年 (平成 22 年) 7 月 27 日に国立衛研にて、改良プロトコルを用い、J-TEC より技術指導がなされた。

B-1-4) 予備試験

各施設において、1-bromohexane が陽性になるよう改良プロトコルのマスターのための予備試験が数回実施された。

B-1-5) 実施期間

バリデーションは 2010 年 (平成 22 年) 9 月～11 月の間に実施された。

B-1-6) 改良プロトコルの概要

本研究は、先回のバリデーションで用いた同一の試験プロトコルに基づいて実施された。コード化された 20 被験物質をモデルに 15 分間処理した後、42 時間後培養を行い、MTT アッセイで細胞生存率を求めた。50% 細胞毒性を基準に陰陽性の判定を実施した。

改訂の主な点は、被験物質の洗い流し方である。洗う回数などに変更はないが、モデルの底面に水流を当てない、洗浄毎に洗浄液を切ることを徹底しない、水分除去に利用していたコットンパッドを利用しないなどが改良された。

B-2) 培養表皮モデル (LabCyte) の phase V バリデーション

B-2-1) バリデーション実行委員会

委員長：小島 肇 (国立衛研)、
委員：加藤雅一 (J-TEC)

B-2-2) 参加施設

- 1) 山口 能宏、中村 牧 (小林製薬株式会社)
- 2) 篠田 伸介、萩原 沙織 (薬物安全性試験センター)
- 3) 笠原 利彦、芝井 亜弥 (富士フィルム株式会社)

B-2-3) トレーニング

平成23年(2011年)6月10日にJ-TEC株式会社にて、改定SOP(標準作業手順書)を用いた技術指導がJ-TEC研究員によりなされた。

B-2-4) 実施期間

検討は平成23年(2011年)8月~9月の間に実施された。

B-2-5) 使用モデル

LabCyte EPI-MODEL24は、ヒト表皮細胞を用いて培養された3次元培養表皮モデルである。

ヒト表皮細胞を培養増殖させた後、気液層界面で培養して、角質層を形成させて、ヒト表皮組織に類似した組織構造を再現している

B-2-6) 改定SOPの概要

本研究は、平成22年度のバリデーションで用いたSOPver. 8. 2の洗浄方法を明確化したSOPver. 8. 3を用いて実施した。被験物質をモデルに15分間処理した後、42時間後培養を行い、MTTアッセイで細胞生存率を求めた。50%細胞毒性を基準に陰陽性の判定を実施した。被験物質除去の際に、PBS(リン酸緩衝液)を多量に用いることは主な改定点である。

B-2-7) 被験物質

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Methodの¹⁰⁾ performance standardに記載されている20物質のうち、昨年度のバリデーションでばらつきの大きかった5被験物質を含む6物質をコード化して参加3施設に配布し、改定SOPを用いたバリデーションを実施した。

コード化された6被験物質は、昨年度のバリデーションにおいて、SD \geq 18%となり、逸脱が多数発生した5被験物質とした。また、performance standardに記載されているものの、昨年度バリデーションにおいて試験されなかった被験物質

tetrachloroethylene である。

B-3) STE法のバリデーション

B-3-1) バリデーション実行委員会

小島 肇(国立衛研)、林和彦、坂口斉(花王)、森本隆史(住友化学株式会社)、ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) 代表、ECVAM代表

・データ解析チーム

大森 崇、音泉 卓(同志社大学)、寒水孝司(京都大学)

・被験物質管理チーム

小島 肇(国立衛研)、林和彦(花王)、森本隆史(住友化学株式会社)

B-3-2) 参加施設

株式会社カネボウ化粧品、ポーラ化成工業株式会社、ライオン株式会社

B-3-3) 実施期間

バリデーションは平成22年(2010年)8月~10月の間に実施された。

B-3-4) プロトコル概要

本研究は、先のSTE法バリデーションで用いた同一の試験プロトコルに基づいて実施した。コード化された40被験物質を用い、それぞれの試料の溶解性に基づき、生理食塩水、5%DMSO含有生理食塩水、およびミネラルオイルのいずれかを溶媒として選択し、5%、0.05%溶液を作成し、SIRC細胞に5分間暴露した後、MTTアッセイにより細胞生存率を求めた。計3回の実験を行い、平均値を求めた。

まず、5%試料液で評価し、STE法における非刺激物、刺激物の刺激区分を行い、その刺激区分とGHS区分(非刺激物、刺激物)との一致性を評価した。次にSTE試験の予測モデルを用いた眼刺激ランクとGHSカテゴリ分類(非刺激物、刺激物: Category2および刺激物: Category1)との一致性を評価した。

B-3-5) 追加実験

一部物質で施設間の結果が食い違った。その原因を明らかにするため、各施設で追加実験が実施された。

B-4) SIRC-CVSアッセイのバリデーション

B-4-1) バリデーション実行委員会

委員長: 簾内桃子(国立衛研)

委員: 萩野滋延(資生堂)、大森 崇(同志社大学)、山影康次(食薬センター秦野研究所)、小島肇(国立衛研)およびWarren Casey(NICEATM/ICCVAM)、Michael Oelgeschlaeger (BfR/ZEBET)

B-4-2) 試験責任者(参加施設)

- 1) 福田隆之 (株)ボゾリサーチセンター)
 - 2) 池田 英史 (日本コルマー株式会社)
 - 3) 韓 美珍 (バイオトクステック:韓国)
- B-4-3) トレーニング

平成23年(2011年)11月10日に仙台にて、ビデオを用いた技術指導が萩野委員によりなされた。

B-4-4) 試験法

SIRC-CVSアッセイは被験物質の72時間処理後において、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方法で生細胞のみを測定する⁷⁾。Crystal violet染色法は多くの細胞に適用でき、得られる結果も比較的安定しているため、細胞毒性の簡易試験法として用いられている。また、操作が簡便で、標本の資料保管が可能であることは本試験法の優位性を示すものである。参照物質として triethanolamine を用い、その細胞毒性と比較してIC50値が3回の結果の多数決により小さい場合に、その物質は眼刺激性物質と判定される⁹⁾。

B-4-5) phase I

(1) 実施期間

平成24年1月～3月の間に実施された。

(2) 被験物質

コード化されていない4被験物質を用い、施設のトレーニングにあたる transfeability を確認する目的で phase I が実施された。

B-4-6) phase II

(1) 実施期間

phase II バリデーションは、予定された20物質を一度に実施した場合の時間的経費的な損失を考慮して、2回に分けて実施され。phase II a で良好な結果が得られた場合のみ、phase II b に進む計画とした。

Phase II a は平成24年6月～8月の間に実施された。

Phase II b は平成24年11月～2013年1月の間に実施された。

(2) 被験物質

phase II バリデーションのため、眼刺激性や物理学的な性質が異なる20被験物質を選択し、phase II a では5物質を、phase II b では15物質をコード化してバリデーション実行委員会から各施設に配布した。

(3) 計画

施設内再現性を確認するため、各物質に

3つのコード番号を付け、合計60物質の試験実施がなされた。施設間・施設内再現性が目的のため、解析のためのコード開示はなされなかった。

B-5) LabCyte CORNEA-MODEL24を用いた眼刺激性試験代替法の共同研究

B-5-1) 参加施設

24施設 (J-TECを含む) が参加した。

B-5-2) 実施期間

実験は、平成24年10月～11月に実施された。

B-5-3) 試験法

培養角膜モデル LabCyte CORNEA-MODEL24 に対し、

(1) 被験物質が液体—培養角膜上皮表面に被験物質を1分間適用する。適用後、被験物質を除去、培養角膜上皮を洗浄した後、新しい培地を用いて24時間後培養を行った。

(2) 被験物質が固体—培養角膜上皮表面に被験物質を24時間適用する。適用後、被験物質を除去、培養角膜上皮を洗浄した。後培養は行わない。

指標としては、WST-8アッセイ (吸光度: 450nm/650nm) による細胞毒性を用いる。3ウェル3回繰り返し実施し、3回の生細胞率の平均から各被験物質の眼刺激性を判定した。

(1) 試験適合基準

下記の全ての基準に適合する場合のみ、試験が成立したと判断した。

陰性対照の生細胞数
 $0.5 \leq \text{吸光度測定値 (平均)} \leq 2.0$

陽性対照が刺激性の判定
生細胞率平均 $\leq 50\%$

SD

3個の培養角膜上皮モデルの生細胞率 (陽性対照、および陰性対照) のSD $\leq 20\%$

(2) 被験物質の判定方法

(1) で試験が成立した各試験における被験物質の生細胞率平均が50%以下の場合に「眼刺激性」、それ以外の場合には「眼非刺激性」と判定した。

B-5-4) 被験物質

参加施設を4グループに分け、各グループに表3に示す被験物質をコード化して、各施設4物質ずつ配布した。

B-5-5) 計画

各施設の結果を、平成24年 (2012年) 11

月初旬を締め切りとして集め、J-TECにおいてコードを開示して解析がなされた。

(倫理面への配慮)

倫理的な問題が生じる実験を実施しておらず、特に配慮すべき問題はない。

C. 研究結果

C-1) 培養表皮モデル (LabCyte EPI-MODEL24) のバリデーション

Phase IVバリデーションの結果、すべての施設で、1-bromohexaneは陽性となった。他の物質の判定結果に変更はなかった。

しかし、3回のSDが18%を超えた場合もすべての施設で見られた。なお、陰性、陽性対照物質は、すべての場合に基準を満たしていた。

3参加施設の内、1施設(Lab A)がコード番号4を陽性と判定したため、specificityが、わずかにperformance standardの基準(acceptance criteriaおよびsuccess criteria)を達成できなかった。その他の結果は、すべて基準を満たしていた。

上記の大きな改善点である洗浄方法を改訂したプロトコルを用いたphase Vバリデーションの結果、表1に示すように、SD \geq 18%となったデータ数(逸脱数)は、今年のバリデーションでは5物質において15データ/56データも存在したが、同物質数で1データ/46データに激減した。洗浄法の改良により、著しくバラツキが少なくデータの安定性は改良された。また、di-n-propyl disulphideを除く5被験物質の判定結果も、全施設で一致した。tetrachloroethyleneは、全試験で刺激性物質と判定された。

C-2) STE法のバリデーション

コード化した被験物質については、3施設がともに実施した10物質ではすべて同じ判定結果が得られ、先のバリデーション同様、施設間再現性が確認できた。

また、先のバリデーションでも用いられた2物質も同様の判定結果となり、バリデーション間の再現性が確認された。

40物質の中で、GHS区分との比較では、コード番号01および25の2物質の判定結果が異なった(GHSカテゴリー分類との比較では、コード番号01、02および25の3物質が異なった)。これらの物質の結果が異なった原因を明らかにするために行った追加実験で、コード番号01の原因は、溶媒

の選択および被験物質の溶解状態の相違であることがわかった。その他の物質については、カットオフ値(70%)前後の細胞毒性による陰陽性結果の違いと判断した。

先のバリデーション結果と結果が確定した60~61物質により一致率を算出したところ、GHS区分の一致率は78%以上(61物質)と高かった(GHSカテゴリー分類との比較では65%(60物質)であった)。

C-3) SIRC-CVSアッセイのバリデーション

Phase Iバリデーションにおいて、Lab Cの習熟度がまだ低く、参照物質であるtriethanolamine、C03、C04の結果が他の施設と比較してばらついていて、そこで、Lab Cには実験を繰り返すように依頼した。その結果、Lab C(追加)の結果は、他の参加施設と同様な結果になった。

Phase IIバリデーションでは、参照物質(triethanolamine)の平均IC50の平均値と標準偏差(SD)は、安定しており、再現性は高いと考えられた。Phase II aおよびII bバリデーションの結果から、20物質の3回の繰り返し、合計60データの判定結果がすべて揃い、施設内および施設間の再現性は極めて高いと判断された。

C-4) LabCyte CORNEA-MODEL24を用いた眼刺激性試験代替法の共同研究

技術移転性については、陽性対照および陰性対照結果より、本プロトコルの習得は容易であった。

施設内再現性については、3回の繰り返し試験で、判定が異なる結果となった試験は、6データ(発生率6/96試験セット:6.3%)であった。これらは、いずれもGHS分類において、区分外(非眼刺激性)に分類される物質であった(発生率6/24試験:25%)。

D. 考察

今回実施したバリデーションは、すべて計画通り実験を実施でき、想定内の結果を得ることができた。

これらの結果を受け、培養表皮モデルLabCyte EPI-MODEL24を用いた皮膚刺激性試験代替法については、平成23年1月末にバリデーション報告書をまとめ、OECD事務局に送付した。

LabCyteを用いた皮膚刺激性試験において、被験物質の除去の際、PBSを大量に用い