

401 セイなど)で陰性結果が得られた場合、さらなる光安全性評価を必要としない場合がある(例外については注5を参照のこと)。それ以外の場合には、その物質の非臨床/臨床光安全性評価を実施すべきである。化学的分類上関連する化合物の光毒性に関して入手可能なデータについては、取るべきアプローチに関する情報がそこから得られる可能性があるため、評価すべきである。

406 経皮投与製剤の光毒性に関して、組織分布は、考慮すべき要因とならない。経皮投与製剤は、皮膚に直接適用されることから、塗布される部位が通常光に曝露されない場合を除き、光に曝露される組織に分布すると見なされる。

410 5.2.2 光毒性および光アレルギーの実験的評価

411 適切な試験条件(たとえば、溶解性の低さに起因する濃度制限がないこと、適切なUVB照射量が確保できること)が得られるのであれば、3T3 NRU PTをAPIおよび新規添加剤、それぞれの光毒性評価に用いることができる。光毒性のある成分が*in vitro*で特定されなかった場合には、その臨床製剤における光毒性ポテンシャルが全体として低いものと考えて差し支えない。

416 臨床製剤において光毒性反応に影響を与えるような性質(たとえば皮膚透過性や細胞内への取り込み)の一部は、3T3 NRU PTのみで評価することができない。したがって、臨床製剤を用いた評価や、臨床試験のモニタリング結果により、総合的な陰性結果の確認が必要である。

420 再構築されたヒト皮膚モデルは、臨床製剤の光毒性の評価に使用可能である。再構築されたヒト皮膚試験法で適切な条件下(第3.3項を参照のこと)において陰性結果が得られた場合には、その製剤の直接的な光毒性ポテンシャルが低いとみなすことができる。この場合、一般にさらなる試験実施は必要ない(例外については注5を参照のこと)。

424 適切な*in vitro*試験法がない場合には、初期評価から臨床製剤を用いて*in vivo*の光毒性試験を実施してもよい。適切に実施された*in vivo*動物試験で陰性結果が得られた場合には、当該製剤が直接的な光毒性を有しないと判断して差し支えなく、さらなる光毒性試験を実施する必要がない(例外については注5を参照のこと)。あるいは、光毒性ポテンシャルを臨床的に評価しても差し支えない。

429 290から700 nmの間どの波長でもMECが $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を上回るAPIあるいは新規添加剤を含む経皮投与製剤については、光毒性に加え、光アレルギーの評価が一般的に必要とされる。非臨床光アレルギー試験の予測性は不明であるため、一般的には市販予定製剤を用いた臨床評価として、第Ⅲ相試験の中で実施される。

433 局所曝露を目的に皮膚貼付剤として適用される臨床製剤の光安全性評価は、上記の経皮投与される臨床製剤に関する原則に従って行う。全身曝露を目的とした皮膚貼付剤に関しては、皮膚適用薬と全身適用薬の両者に関する原則を適用する。さらに、全体的リスク評価においては、意図する臨床における用法(使用時に奨励される皮膚領域、適用期間など)や貼付剤基剤の特性(UVと可視光を通さないなど)を考慮する。

438

439

440

441 <図1 挿入>

442 図1 全身および皮膚経路で投与される医薬品に関して考えられる光毒性評価方法の
443 概要

444 * データにより光毒性の懸念が小さいことが立証されない、あるいはデータがない
445 (試験法/試験/評価が行われない) 場合を指す。

446 # 適切に行われた*in vivo*光毒性試験における“陰性”の結果は、*in vitro*での陽性結果
447 に優先する。適切に実施された臨床光安全性評価で懸念が示されなかった場合は、
448 非臨床での陽性結果に優先する。*In vitro*光毒性試験における陽性結果は、組織分布
449 データにより、有効性を失う場合がある(本文参照)。米国では、皮膚適用される
450 製品に関しては、市販予定製剤を用いた光安全性の臨床評価が必要になる場合があ
451 る。

452 \$ 臨床試験での一般的有害事象報告から、光安全性評価のための臨床試験まで及ぶ。

453 § 組織分布は皮膚適用する医薬品の光毒性のための考慮事項でない。

454

455 6. 注釈

456

457 注1: 該当する波長を吸収し、MECが $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を超える眼に投与される化合物
458 (点眼薬、眼内投与される薬剤など) については、光毒性ポテンシャルの評価を、光
459 毒性評価の一般原則に従って行うべきである。眼における薬剤の分布および眼の光学
460 的特性も考慮すべきである。化合物あるいは化学的分類上関連する化合物に関して入
461 手できるすべてのデータは、総合的評価の中で考慮すべきである。

462 400 nm 未満の波長の光だけを吸収し、水晶体よりも後方 (硝子体など) に眼内投与さ
463 れる化合物に関しては、成人の後眼部に到達する光が 400 nm 以上に限られることから、
464 網膜光毒性に関する懸念が少ない。しかしながら、およそ 10 歳未満の小児の水晶体は
465 400 nm 未満の波長の光を完全には防御しない。

466 注2: 光遺伝毒性試験を標準的な光毒性試験プログラムの一部として実施することは推
467 奨されない。過去にいくつかの地域的なガイドライン (たとえば CPMP/SWP/398/01)
468 では、特に *in vitro* のほ乳類細胞を用いた光染色体異常誘発性試験 (染色体異常試験あ
469 るいは小核試験) の実施を推奨していた。しかしながら、CPMP/SWP ガイドラインが
470 発行されて以降のこれらのモデルにおける経験より、これらの試験は感度が過剰に高
471 く、光染色体異常の偽陽性結果が生じることが報告されてきた (文献8)。さらに、光
472 遺伝毒性試験データの解釈、すなわち臨床的に関連性のあるUV依存性の皮膚がん増加
473 に対する意義は不明瞭である。

474 注3: MEC測定のための標準化された条件は非常に重要である。適切な溶媒の選択につ
475 いて、分析に必要な条件 (たとえば溶解性やUV~可視領域の光の透過性) と生理学的
476 な妥当性 (たとえばpH 7.4の緩衝液) の両面から決定すべきある。メタノールは望まし
477 い溶媒として推奨されており、MECの閾値を $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ とする際に用いられた
478 (文献3)。UV~可視領域の光のスペクトルを測定する際には、潜在的な限界 (たと
479 えば、高濃度あるいは低溶解性に起因するアーティファクト) について考慮すべきで
480 ある。もし、分子中のクロモフォアがpH感受性を有すると考えられる場合 (たとえば、
481 フェノール構造や芳香族アミン/カルボン酸など) には、水性のpH 7.4の緩衝条件下で
482 追加的スペクトル測定を行うことにより、吸光スペクトルやMECの差異に関する有益
483 な情報が得られる。メタノール中での測定とpH調整条件での測定の間に関連する差が認
484 められた場合には、 $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ というMECの閾値を用いることはできない。

485 注4: 製薬企業が実施した調査では、OECD TG 432に述べられている3T3 NRU PTに
486 おいて高い割合 (約50%) で陽性結果が得られ、その大部分が動物やヒトでの反応と
487 関連しないことが示されている (文献9)。医薬品のデータの遡及的調査を受けて、試
488 験の最高濃度を1000から $100 \mu \text{g/mL}$ に下げることが適切とされた (文献10)。光照射
489 条件下でこの濃度まで細胞毒性を示さない化合物は光毒性を有さないと考えて差し支
490 えない。さらに、全身適用薬では、OECD TG 432で「光毒性の可能性あり」とされる
491 カテゴリー (すなわちphoto irritation factor (PIF)値が2~5の間、あるいはmean photo effect
492 (MPE)値が0.10~0.15の間) の場合、毒性学的関連性が疑わしい。このカテゴリーに含ま
493 れる化合物に関しては、一般的に光安全性評価をさらに行う必要がない。PIF値が2~5
494 の化合物で照射なしでIC₅₀を測定することができない場合には、MPEの計算で陽性に分
495 類されないこと、すなわちMPEが0.15未満であることを確認することが重要である。

496 光に当たるヒト組織で到達すると考えられる濃度よりもかけ離れて高い*in vitro*濃度の
497 みで3T3 NRU PTが陽性となった全身適用薬に関しては、ケースバイケースで、また規
498 制当局との協議の上、追加の*in vivo*試験を行わずに、ヒトでの光毒性に関して「低リス
499 ク」であると考えることができる場合もある。

500 注5：米国では皮膚適用される製品に関しては、製品認可に必要な市販予定製剤（API
501 およびすべての添加剤）を用いた光毒性（光刺激性）臨床試験が必要となる場合があ
502 る。

503

504 7. 用語の解説

505 **3T3 NRU PT**： *In vitro* 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test（3T3ニュートラルレッ
506 ド取り込み光毒性試験）。

507 評価：本ガイドライン内の意味としては、入手できるすべての情報を用いて判断を行
508 うことであり、必ずしも追加試験を実施することを意味するわけでない。

509 クロモフォア：可視光あるいはUVを吸収する分子の部分構造。

510 経皮適用薬：皮膚に局所適用される医薬品。

511 直接的光毒性：医薬品あるいは添加剤が光を吸収することにより引き起こされる光毒
512 性。

513 間接的光毒性：医薬品あるいは添加剤により引き起こされる細胞学的、生化学的、生
514 理学的変化による光毒性であるが、医薬品あるいは添加剤の光化学的反応に関連しな
515 いもの（ヘム代謝の攪乱など）。

516 照度：照射されるUVあるいは可視光の単位面積当たりの強度であり、W/m²あるいは
517 mW/cm²で表される。

518 照射：ある物体がUVあるいは可視光に曝露される過程。

519 **MEC**： Molar Extinction Coefficient（モル吸光係数）は、ある特定の波長において分子
520 が光子を吸収できる効率を反映し（通常L mol⁻¹ cm⁻¹で表される）、溶媒などいくつか
521 の要素による影響を受ける。

522 **MPE**： Mean Photo Effectは、3T3 NRU PTの結果から算出される。MPEは完全な濃度反応
523 曲線との比較に基づく（OECD TG 432を参照）。

524 **NOAEL**： No Observed Adverse Effect Level（無毒性量）。

525 **OECD TG**： 経済協力開発機構試験法ガイドライン。

526 外来での臨床試験：患者が臨床試験実施施設に拘束されない臨床試験。

527 光反応生成物：光化学反応の結果として生じる新規化合物/構造。

528 光反応性：光の吸収の結果として他の分子と反応する化学物質の性質。

529 **PIF**： Photo Irritation Factorは3T3 NRU PTの結果から算出される照射時および非照射時
530 のIC₅₀値の比。

531 **ROS:** Reactive Oxygen Speciesはスーパーオキシドアニオンや一重項酸素などを含む活
532 性酸素種。

533 全身適用薬：全身曝露を意図して投与される医薬品。

534 **UVA:** 紫外線A (波長320–400 nm)。

535 **UVB:** 紫外線B (波長280–320 nm; 地上に到達する太陽光の一部としては波長290–320
536 nm)。

537

538 8. 参考文献

539

540 1. ICH M3(R2) Guideline: Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human
541 Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals; June 2009.

542

543 2. ICH S9 Guideline: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals; Oct. 2009.

544

545 3. Bauer D, Averett LA, De Smedt A, Kleinman MH, Muster W, Pettersen BA,
546 Robles C. Standardized UV-vis spectra as the foundation for a threshold-based,
547 integrated photosafety evaluation. *Regul Toxicol Pharmacol* 2014;68(1):70-5.

548

549 4. ICH Q1B Guideline: Stability Testing: Photostability Testing of New Drug
550 Substances and Products; Nov. 1996.

551

552 5. CIE-85-1989: Solar Spectral Irradiance; Jan. 1989.

553

554 6. OECD (2004), *Test No. 432: In vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test*, OECD
555 Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing.

556

557 7. Onoue S, Igarashi N, Yamada S, Tsuda Y. High-throughput reactive oxygen
558 species (ROS) assay: An enabling technology for screening the phototoxic
559 potential of pharmaceutical substances. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 46(1): 187–193.

560

561 8. Lynch AM, Robinson SA, Wilcox P, Smith MD, Kleinman M, Jiang K, Rees RW.
562 Cycloheximide and disulfoton are positive in the photoclastogenicity assay but
563 do not absorb UV irradiation: another example of pseudophotoclastogenicity?
564 *Mutagenesis* 2008 ; 23(2):111-118.

565

566 9. Lynch, AM, Wilcox, P. Review of the performance of the 3T3 NRU *in vitro* phototoxicity
567 assay in the pharmaceutical industry. *Exp Toxicol Pathol* 2011; 63(3): 209-214.

568

569 10. Ceridono M, et al. Workshop Report: The 3T3 neutral red uptake phototoxicity
570 test: Practical experience and implications for phototoxicity testing – The report
571 of an ECVAM–EFPIA workshop. *Regul Toxicol Pharmacol* 2012; 63(3): 480–488.

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
平成25年度分担研究報告書

がん原性試験に関する研究

研究分担者：西川 秋佳（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）

研究協力者：中江 大（東京都健康安全研究センター）

小川久美子（国立医薬品食品衛生研究所 病理部）

野中 瑞穂（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）

小野寺博志（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）

甘粕 晃平（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）

三枝由紀恵（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）

久田 茂（あすか製薬株式会社、日本製薬工業会）

青木 豊彦（エーザイ株式会社、日本製薬工業会）

福田 良（武田薬品工業株式会社、日本製薬工業会）

務台 衛（田辺三菱製薬株式会社、日本製薬工業会）

アドバイザー：中村 和市（塩野義製薬株式会社、日本製薬工業会）

オブザーバ：笛木 修（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）

研究要旨

医薬品の長期がん原性試験に関する見直し作業が開始された。この動きは、それまで少なくとも6カ月を超えて使用される低分子医薬品に対して、原則としてラットおよびマウスの長期がん原性試験が必要とされてきた方向から、1997年にマウスの長期がん原性試験をオプションとした改定以来の大きな見直しとなる。今回の見直しは、医薬品の薬理作用と毒性所見から、実験動物およびヒトに対するがん原性の有無が予測できない場合にのみ、げっ歯類（特にラット）の長期がん原性試験を実施する意義があるという基本理念に基づいている。この基本理念は、いくつかのデータベースの詳細な解析に基づいているが、あくまでもretrospectiveなものであることから、prospectiveな妥当性確認が必要である。現在、prospectiveな確認のための「規制通知文書（案）」を最終化する作業が進んでいる。「規制通知文書（案）」では、患者の安全性を損なうことなく、医薬品のがん原性評価を改善し、3R（使用動物数の削減／苦痛の軽減／代替法の利用）の原則にしたがって動物の使用を抑え、他の医薬品開発資源の使用を減少させ、ときに市販承認までの時間を短縮することも期待されると提案されている。この医薬品規制当局によるprospectiveな確認作業が成功するか否かは、「がん原性評価文書」の提出を含めた製薬企業の積極的な参加に依るところが大きい。本研究では、長期がん原性試験を省略できるとする科学的重みづけの妥当性をprospectiveに検証した上で、長期がん原性試験の見直しについて検討する。

キーワード：がん原性試験、非臨床安全性試験、試験法ガイドライン、国際標準化

A. 研究目的

環境化学物質による発がんリスクは、その重篤性において最も懸念すべき有害影響の一つといえる。そのため、実験動物による発がん性評価は、ラットおよびマウスの長期がん原性試験に基づいて実施されてきており、医薬品を除く農薬、食品添加物等の発がん性評価では現在までその方針が踏襲されている。医薬品についても、従来のICH 3極における発がん性評価のための行政上の要求は、通常ラットとマウスの2種のげっ歯類を用いる長期のがん原性試験を実施することと規定されていた。しかし、これらの試験には費用がかかりすぎることやきわめて多くの動物が用いられることが懸案事項として指摘され、1990年代当初のICHにおいて、ヒトへの安全性を損なうことなく2種のがん原性試験を1種にすることができるか検討された。その結果、原則として1種の長期げっ歯類がん原性試験に加えて、短期あるいは中期の*in vivo*げっ歯類試験系が他の1種のげっ歯類のがん原性試験の代替として容認されることになった。それが現行の医薬品のがん原性試験に関するICHガイダンスである。その後、低分子医薬品の毒性データや薬理学的知見を評価することによって、2年間げっ歯類がん原性試験の結果を予測し、ヒトにおける発がんリスクを推測するために十分な情報が得られる場合があるとの解析結果が報告された。つまり、特定の条件を満たす医薬品については、2年間げっ歯類がん原性試験を省略できるとする仮説が立てられている。現在、ICHにおいてその仮説の妥当性をprospectiveに確認する作業が開始されている。

B. 研究方法

2012年6月のICH福岡会議で第1回専門家会合がもたれ、Step 1に向けて、主としてラット2年間がん原性試験を省略できるか判断するための証拠の重み付け (weight-of-evidence : WOE) についての討議がなされた。続いて、2012年11月のICHサンディエゴ会議での第2回専門家会合では、prospectiveな検証作業を実施するための「規制通知文書(案)」を作成した後、パブリックコメントを集約して、2013年

6月のICHブリュッセル会議で「規制通知文書(案)」の改定作業を開始し、同年8月に最終化した。同年10月にprospectiveな検証期間が開始された。prospectiveな検証作業を実施するとともに、並行してStep 2文書の草案を作成する。現時点においては、2017年11月にStep 2文書、2018年11月にStep 4文書を完成する見込みとなっている。

「規制通知文書」は、医薬品開発企業が2年間げっ歯類がん原性試験の省略を求める「免除申請」を行う場合に、その根拠を示す「がん原性評価文書」を規制当局に提出することを想定している。すなわち、「がん原性評価文書」には、WOEによって予測される医薬品の総合的な発がんリスクとともに、2年間げっ歯類がん原性試験の実施が発がん性評価に意義があるか否かの根拠を示すことになる。prospectiveな検証期間を設け、その間に、2年間げっ歯類がん原性試験が進行中または計画されているすべての開発医薬品についての「がん原性評価文書」を医薬品規制当局に提出することを企業に求める。各極の医薬品規制当局は、提出された「がん原性評価文書」を独自に審査し、企業との見解の一致および各極の医薬品規制当局間の見解の一致の程度を調査する。提出された「がん原性評価文書」は実施した2年間げっ歯類がん原性試験の結果と比較され、実際の試験結果に対する予測の正確性および適切性が評価される。

6ヵ月間あるいはそれより短期の毒性試験を含む様々な薬理学的および毒性学的データを統合することにより、WOEに基づいて、その医薬品が以下の3つのカテゴリーのいずれに分類されるかを十分な確実性をもって予測する。

カテゴリー1：ヒトにおいて発がん性がある可能性が高いため、製品の添付文書にその旨が明記されることから、2年間ラットがん原性試験の実施意義はない。

カテゴリー2：入手可能な薬理学的および毒性学的データのセットからは、ヒトに対する発がん性を確実に予測することができず、2年間ラットがん原性試験によりヒトのリスク評価に意義が付加される可能性が高い。

カテゴリー3a：ラットにおける発がん機序がすでに立証され広く認識されており、かつヒトへの外挿性がないこと、即ちラットにおいては発がん性があるがヒトにおいては発がん性がない可能性が高いことが知られているため、2年間ラットがん原性試験の実施意義はない。

カテゴリー3b：ラットおよびヒトにおいて発がん性がない可能性が高いため、2年間ラットがん原性試験は不要である。

医薬品規制当局と企業の予測との間、ならびに各規制当局の間での予測の一致率を評価するために、規制当局による会議が定期的開催される予定である。2年間ラットがん原性試験結果の受領後、①「がん原性評価文書」に記載されたWOEに基づく2年間ラットがん原性試験での腫瘍発生予測と実際の結果を比較し、予測が正確であったかどうか、②実施されたがん原性試験の総合的な結果と比較し、企業及び各医薬品規制当局が行ったカテゴリー分類が正確であったかどうか、③腫瘍発生予測と実際の腫瘍発生に差異があった場合、規制にどのような影響を及ぼすかについて、「がん原性評価文書」の再評価が行われる。

「がん原性評価文書」の評価は、医薬品医療機器総合機構内に審査事務局を置き、国立医薬品食品衛生研究所内に設置された特別の審査委員会において実施している。

C. 研究結果

2014年2月までに、FDAに対して4通の「がん原性評価文書」が提出され、審査委員会での評価が終了した。一方、がん原性試験を省略できるかを規定するWOEの各要素について、早急に論文化することが検討されている。また、「がん原性評価文書」に記載すべきカテゴリー分類について、各カテゴリーの代表例の作成も進められており、論文化をめざすことが合意されている。

D. 考察

「がん原性評価文書」では、がん原性に関連があると考えられる各要素について論じるものであって、

当該医薬品の非臨床プロファイルの一般的な概要を示す必要はなく、また「規制通知文書」に記載されたすべての要素が必ずしもすべての場合に適用または利用できるわけではないとされている。「がん原性評価文書」にはWOE以外に、次の重要な要素である①計画中／進行中の2年間ラットがん原性試験について予測される試験結果（陽性／腫瘍発生に対する標的臓器、または陰性）、②がん原性試験に関する総合評価およびヒトに対するリスク評価における2年間ラットがん原性試験結果の実施意義の予測、③2年間ラットがん原性試験を実施するか免除申請するかどちらを裏付けるのかについての明確な記述および説明とそれぞれの化合物のカテゴリー分類、を含めなければならない。各極の医薬品規制当局は、提出された「がん原性評価文書」の予測の妥当性について、「がん原性評価文書」受領時にそれぞれ独自に評価するが、開発企業に対してのフィードバックはがん原性の評価において上記の3つの重要な要素に関する記述が不十分であった場合のみその旨の通知を行うことになる。

ヒトにおいて発がん性の可能性が高いことを予測するカテゴリー1は主に薬理作用によって判定されることになる。一方、カテゴリー3bは主として毒性所見によって判定されることになるが、カテゴリー3aを含めて、ヒトにおける発がん性の可能性がないことを予測できる事例がどれほど集まるか興味深いところである。

ICH S1ガイダンスに記載されている低分子医薬品のがん原性評価について現行の枠組みの見直しを検討しているS1専門家会合の活動にとって、このprospectiveな確認作業の経験は非常に重要であると考えられる。

prospectiveな検証作業を開始してから、5カ月を経過したが、これまでに4通の「がん原性評価文書」が提出されたのみであり、年間25通程度のペースとして最低限必要な50通に2年間で達するとの見込みを大きく下回る提出状況は、今後の見直し作業が大幅な遅延を余儀なくされる懸念がある。

E. 結論

ICH S1において、げっ歯類（特にラット）を用いる長期がん原性試験についての見直し作業が開始された。今回の見直しは、医薬品の薬理作用およびより短期の毒性試験情報からヒトおよび実験動物に対するがん原性の有無を予測し、予測が難しいまたはできない場合にのみ、長期のがん原性試験を実施する意義があるという基本理念に立脚している。この基本理念は、いくつかのデータベースの詳細な解析に基づいているが、あくまでもretrospectiveなものであることから、prospectiveな検証作業が求められている。「がん原性評価文書」の提出状況はこれまで低調であり、改定作業の遅れが心配される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究成果

1. 論文発表

西川秋佳. 安全性等に関するトピックの動向. ICH S1A Informal Working Group Meetingの進捗状況. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 43, 726-731, 2012.

西川秋佳、小川久美子、中江大、三森国敏. 医薬品のがん原性試験の歴史と課題. レギュラトリーサイエンス学会誌 3, 165-173, 2013.

西川秋佳、野中瑞穂、小川久美子. 安全性に関する

トピックの動向—S1 がん原性試験（見直し）. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 44, 939-945, 2013.

2. 学会発表

西川秋佳, 野中瑞穂, 小川久美子. ICH S1の最新動向. シンポジウム8—慢性毒性試験結果からの発がん性予測. 第39回日本毒性学会学術年会（2012年7月, 仙台）

久田茂, 澤田繁樹, 工藤哲, 和藤英司, 熊澤俊彦, 森山賢二, 三島雅之, 笠原義典, 鬼頭耀子, 井上健司, 青木豊彦, 中村和希. 医薬品のラットにおけるがん原性陰性の予測性に関するデータ調査. 第39回日本毒性学会学術年会（2012年7月, 仙台）

野中瑞穂, 小川久美子, 小野寺博志, 中江大, 西川秋佳. 医薬品のがん原性評価の方法について—ICH S1 EWGにおける検討内容. 第29回日本毒性病理学会学術集会（2013年1月, つくば）

野中瑞穂, 小川久美子, 小野寺博志, 中江大, 西川秋佳. 医薬品のがん原性の評価方法変更の提案について—ICH S1 EWGにおける検討内容. 第40回日本毒性学会学術年会（2013年6月, 千葉）

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

医薬品の安全性評価のための*in vitro*毒性試験についての評価

研究分担者：小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所）

研究要旨

ICH光毒性試験ガイドライン（S10）に、日本で開発された光毒性スクリーニング法 ROS（Reactive Oxygen Species：活性酸素種）アッセイを掲載させるため、バリデーションが日本製薬工業協会およびJaCVAM（日本動物実験代替法評価センター）の協力にて実施された。このバリデーション報告書に対する国際的な第三者評価会議が昨年度に開催され、バリデーション報告書や提案プロトコルの改訂が求められた。この要求に応じて改訂された書類を用いて、第三者評価委員会が再検討し、第三者評価報告書を完成した。結果として、ROSアッセイは光安全性評価のため、時間、経費、動物数の削減に有用であると結論された。

キーワード：*in vitro*、光毒性試験、医薬品、安全性評価、動物実験代替法

分担研究者および協力研究者の氏名・所属機関名および所属機関における職名

尾上 誠良（静岡県立大学 准教授）

細井 一弘（参天製薬株式会社、日本製薬工業協会）

高木 広憲（大正製薬株式会社、日本製薬工業協会）

中村 和市（塩野義製薬株式会社、日本製薬工業協会）

岩瀬裕美子（田辺三菱製薬株式会社、日本製薬工業協会）

A. 研究目的

ICH（International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use：日米EU医薬品規制調和国際会議）光毒性試験ガイドライン（S10）への掲載を目指している光毒性スクリーニング法であるROS（Reactive Oxygen Species：活性酸素種）アッセイは、尾上らによって開発され¹⁾、日本製薬工業協会およびJaCVAM（Japanese Center for the Validation of Alternative Methods:日本動物実験代替法評価センター）にて、バリデーションが実施された^{2,3)}。この結果をICH光毒性試験ガイドライン（S10）検討グル

ープにて報告したところ、バリデーション報告書の第三者評価実施が要求された。そこで、光毒性およびバリデーションの国際的な専門家を招聘し、第三者評価会議が昨年度開催された。その会議にてバリデーション報告書や提案プロトコルの改訂が求められたことから、バリデーション実行委員会が改訂を検討した。本年度、改訂された書類を用いて、第二回第三者評価会議を開催し、報告書の完成を目指した。

B. 研究方法

B-1) バリデーションの概要

コード化された42種類の被験物質（200 μM）を含む反応液を96ウェルプレートに分注してソーラーシミュレーター（Atlas Suntest CPS series およびSeric）による1時間の擬似太陽光照射後（1.9～5.0 mW/cm²）、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。

Atlas Suntest CPS seriesのバリデーションには3施

設が、Sericのバリデーションには4施設が参加した。それぞれの結果はバリデーション報告書としてまとめられた^{2,3)}。

B-2) 第三者評価組織

国際的な光毒性あるいはバリデーションの専門家を第三者評価委員として招聘した。

1) Horst Spielmann (Berlin Free Univ.)

ZEBET (National Centre for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments) の元リーダー、光毒性の専門家、OECD TG432 (光毒性試験代替法) の作成者

2) William S. Stokes (Consultant)

獣医師、バリデーションの専門家、NICEATM (The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) の元リーダー

3) Bae-Hwan Kim (Keimyung University)

獣医師、アモレパシフィック化粧品の元研究員

4) 堀井郁夫 (ファイザー)

毒性学者、ケンブリッジ大学客員教授、ファイザー日本研究所 元所長

B-3) 昨年度の動向

B-3-1) 第一回 第三者評価会議

平成25年2月27日～3月2日において、以下のスケジュールにより第三者評価会議が東京にて開催された。

2月27日 ICH S10におけるROSアッセイの位置づけ、試験法概要説明、バリデーション報告書説明

2月28日 提案プロトコルの紹介、評価手順の確認、B-3-2に示す質問への回答を作成する方式で第三者評価を進めた。

3月1日 同上

3月2日 総括

B-3-2) 第三者評価のために用意した質問

本評価委員会での議論を活発にするため、上記の項目に準じた以下の質問を用意した。

質問1 : A rationale for the test method should be available, including description of toxicological mechanisms, a clear statement of scientific need, and regulatory application (試験法の科学的、規制上での妥当性)

質問2 : The relationship between the test method endpoint(s) and the biological effect and to the toxicity of interest should be addressed, describing limitations of the test methods (試験法の定義)

質問3 : A detailed test method protocol should be available (プロトコルの構成の妥当性)

質問4 : Within- and between-laboratory reproducibility of the test method should be demonstrated (試験法の信頼性)

質問5 : Demonstration of the test method's performance should be based on testing of representative, preferably coded reference chemicals (バリデーションに用いられた物質の分類)

質問6 : Accuracy or predictive capacity should be demonstrated using representative chemicals. The performance of test methods should have been evaluated in relation to existing relevant toxicity data as well as information from the relevant target species (試験法の正確性)

質問7 : All data supporting the assessment of the validity of the test method should be available for expert review (データと結果の利用性)

質問8 : all data supporting the validity of a test method should have been obtained in accordance with the principles of Good Laboratory Practice (GLP) (データの質)

質問9 : Applicability domain of the validity of the test method should be defined for expert review (試験法の有用性と限界)

質問10 : Proficiency chemicals should be set up in the proposed protocol (習熟物質の選択)

質問11 : Performance standard should be set up with proposed protocol (性能標準の必要性)

質問12 : Advantages in terms of time, cost and animal welfare (時間的、コスト的な有利さと、3Rsへの

関与)

B-4) 本年度の動向

B-4-1) 第三者評価委員会からバリデーション実行委員会への提言

第一回第三者評価会議における提案を以下に示す。

- ・コード化した物質を用いた実験は、phase2研究のみであり、データは限定されている。これらのデータを用いて、感度、特異度、陽性予測率、陰性予測率、および正確度を評価する。このデータセットの範囲内で、陰性予測率は100%と高い。
- ・5-FUはヒト光毒性を引き起こすか疑わしい。5-FUのヒトデータは信頼性の高いヒトデータか再調査する。
- ・溶解性を考慮に入れてデータベースを拡大するためには、20 μ Mによる（陰性）結果を受け入れるべきである。
- ・特異度が低いことが問題である。可能なら、バリデーション結果の受入れ基準を再検討すべきである。

バリデーション実行委員会は本問題に真摯に対応し、バリデーション報告書およびプロトコルを改訂した。

B-4-2) 第二回 第三者評価会議

平成25年8月20日～8月21日において、以下のスケジュールにより評価会議が東京にて開催された。

8月20日 ICH S10の動向紹介、改訂バリデーション報告書およびプロトコルの説明、および質疑応答

8月21日 報告書案の改訂内容について

B-4-3) 最終報告書の完成

第二回会議終了後、メールで最終報告書案について意見交換がなされ、10月中旬に最終報告書が第三者評価委員会から提出された。

(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

ROSアッセイのバリデーション報告書をもとに、第三者評価をB-3-2)に示す質問に回答する形式で進めた。それぞれの質問に対して、評価者より適切な回答を作成することができた。以下に示すような主な議論がなされた。

コード化した物質を用いて行われたphase2研究が再解析された。

バリデーション実行委員会のメンバーは、5-FUのヒト光毒性を再調査した。その結果、5-FUが光毒性を引き起こすヒト結果の信頼性は高くなかった。5-FUの光毒性は不明と判断した。

バリデーション実行委員会のメンバーは、ロシグリタゾンのヒト光毒性を再調査した。ロシグリタゾンのヒトデータの信頼性は高くなかった(3T3 NRU-PTは陽性だった)。ロシグリタゾンは解析から削除されることになった。データセットは42から41となった。

20 μ Mの陰性結果はバリデーション結果において偽陰性を引き起こさなかったため、データ再解析に取り入れることにした。推奨プロトコル(添付資料1)では、ROSアッセイは20および200 μ Mの濃度で実施される。

活性酸素のカットオフ値は20から70に変更すると、バリデーション結果で見られた偽陰性はなくなった。

一重項酸素および活性酸素のカットオフ値をそれぞれ25および70とすれば、アミオダロン、アモキサピン、ブフェキサマックおよびハロペロドールはすべて基準値以下になる⁴⁾。これら医薬品の光毒性は顕著でなくなり、これら医薬品の光毒性の可能性に関する有害事象に配慮することはないと思われる。

表に示すように、一重項酸素および活性酸素のカットオフ値をそれぞれ25未満および20から70の間は、弱い光反応物質と判断することが適切と考察できる。

ROSアッセイの判定基準は、陽性および陰性から光反応物、弱い光反応物、非光反応物と変えることを提案したい。光反応物、弱い光反応物は追加試験が必要である。非光反応物は光毒性の可能性が低い

ことを示している。

以上のような議論を経た後、第三者評価委員会は、以下のように結論した。なお、詳細は添付資料2に示す評価報告書に記す。

ROSアッセイの再現性と予測性は、医薬品の研究開発における決定戦略および総合的な光安全性試験の一つとして十分な試験法であると結論できる。この総合的な戦略の中で、ROSアッセイで陰性の場合には、動物実験や他の試験は不要である。一方、陽性、弱い陽性、結論が出ない場合には、3T3光毒性試験 (OECD Test Guideline 432⁵⁾) のような*in vitro*試験という次の試験に進むことになる。

ROSアッセイは光安全性評価のため、時間、経費、動物数の削減に有用である。さらに、光安全性試験戦略の中でROSアッセイは、追加試験である*in vitro* 3T3アッセイの試験物質数を減らすことができるとともに、引き続き、動物試験を実施する物質数を減らすことができる。

D. 考 察

今回の国際的な第三者評価会議を経て、ROSアッセイの評価報告書を完成することができた。同時に、第三者評価委員からの指摘でバリデーション報告書や提案プロトコルも改訂できた。これらを10月中旬にICH S10検討グループに送付した。これを受け、ICH S10検討グループはROSアッセイをガイドラインに掲載することを決めた。

E. 結 論

ROSアッセイのバリデーション報告書を受け、昨年度～本年度に掛け、国際的な第三者評価会議が実施された。この会議にて、バリデーション報告書や提案プロトコルの改訂が求められた。改訂されたROSアッセイは、光安全性評価のため、時間、経費、動物数の削減に有用であると結論された。

表 Revised judgment criteria

Judgment ¹⁾	Concentration	SO (mean value of 3 wells)	SA (mean value of 3 wells)
Photoreactive	20 and/or 200 μM ²⁾	≥ 25	and ≥ 70
		< 25 and/or P ³⁾	and ≥ 70
		≥ 25	and < 70 and/or P ³⁾
Weakly photoreactive	20 and/or 200 μM ²⁾	< 25	and $\geq 20, < 70$
Non-photoreactive	20 and 200 μM ²⁾	< 25	and < 20
Inconclusive	The results do not meet the other criterion. ⁴⁾		

Notes

- 1) It can be judged based on results of one experiment because the ROS assay shows good reproducibility in the validation studies.
- 2) It would be judged at 20 μM only when precipitation is observed at 200 μM .
- 3) Precipitation before irradiation.
- 4) When precipitation is observed at 20 and 200 μM before irradiation, the compound is regarded incompatible with the ROS assay.

1

F. 参考文献

- 1) Onoue S, Tsuda Y.: Analytical studies on the prediction of photosensitive/phototoxic potential of pharmaceutical substances. *Pharm Res.* 23(1):156-64 (2006)
- 2) 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.* (2012)
- 3) Onoue S, Hosoi K, Toda T, Takagi H, Osaki N, Matsumoto Y, Kawakami S, Wakuri S, Iwase Y, Yamamoto T, Nakamura K, Ohno Y, Kojima H : Intra-/inter-laboratory validation study on reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation using two different solar simulators., *Toxicology In Vitro*, 28(4), 515-523 (2013)
- 4) Onoue S, Igarashi N, Yamada S, Tsuda Y. High-throughput reactive oxygen species (ROS) assay: An enabling technology for screening the phototoxic potential of pharmaceutical substances. *J Pharm Biomed Anal* 2008;46(1):187-93.
- 5) OECD test guideline 432; OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: *In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. (2004)
- 6) 小島 肇夫 : 技術講座 安全性評価試験 (20) 遺伝毒性試験－哺乳類の培養細胞を用いる試験、COSME TECH JAPAN, 3(6) 72-77 (2013)
- 7) Kojima H, Hayashi K, Sakaguchi H, Omori T, Otoizumi T, Sozu T, Kuwahara H, Hayashi T, Sakaguchi M, Toyoda A, Goto H, Watanabe S, Ahiko K, Nakamura T, Morimoto T. : Second-phase validation study of short time exposure test for assessment of eye irritation potency of chemicals., *Toxicology In Vitro*, 27(6), 1855-69 (2013)
- 8) 小島 肇夫 : 技術講座 安全性評価試験 (21) 遺伝毒性試験－げっ歯類を用いる小核試験、COSME TECH JAPAN, 3(7) 116-120 (2013)
- 9) 小島 肇夫 : 技術講座 安全性評価試験 (22) ウサギを用いる眼刺激性試験、COSME TECH JAPAN, 3(8) 67-71 (2013)
- 10) 小島 肇夫 : 化粧品・医薬部外品およびその原料の安全性評価と規格・試験法設定、サイエンス&テクノロジー、29-65 (2013)
- 11) Yamaguchi H, Kojima H, Takezawa T : Vitrigel-Eye Irritation Test Method using HCE-T cells, *Toxicological Sciences*, 135(2), 347-55 (2013)
- 12) 小島 肇夫, 技術講座 安全性評価試験 (23) 実験動物を用いる皮膚刺激性試験、COSME TECH JAPAN, 3(9) 81-84 (2013)
- 13) 小島 肇夫 : *In vitro* 毒性・動態評価の最前線、シーエムシー出版、1-7 (2013)
- 14) Kojima H, Katoh M, Shinoda S, Hagiwara S, Suzuki T, Izumi R, Yamaguchi Y, Nakamura M, Kasahawa T and Shibai A : A catch-up validation study of an *in vitro* skin irritation test method using reconstructed human epidermis LabCyte EPI-MODEL24, *Journal of Applied Toxicology*, (2013)
- 15) 小島 肇夫 : 技術講座 安全性評価試験 (24) 実験動物を用いる連続皮膚刺激性試験、COSME TECH JAPAN, 3(10) 22-25 (2013)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 小島 肇夫 : 技術講座 安全性評価試験 (18) 遺伝毒性試験－組合せ、COSME TECH JAPAN, 3(4)74-77 (2013)
- 2) 小島 肇夫 : 経皮吸収型製剤の安全性を考える、*ファルマシア*、49(5)、415-419 (2013)
- 3) 小島 肇夫 : 技術講座 安全性評価試験 (19) 遺伝毒性試験－エイムス試験、COSME TECH JAPAN, 3(5) 82-85 (2013)
- 4) 小島 肇夫 : 動物実験代替安全性試験プロトコ

- 16) 小島 肇夫：技術講座 安全性評価試験 (25) 実験動物を用いる皮膚一次刺激性試験、COSME TECH JAPAN, 3(11) 36-39 (2013)
- 17) 小島 肇夫：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回大会記念誌、27-34 (2013)
- 18) 小島 肇夫：経皮吸収性の試験法と評価法、株式会社 情報機構、1-54 (2013)
- 19) 小島 肇夫：技術講座 安全性評価試験 (26) 実験動物を用いない眼刺激性試験、COSME TECH JAPAN, 3(12) 44-48 (2013)
- 20) Stokes W, Srinivas G, McFarland R, Kulpa-Eddy J, Casey W, Walker A, Draayer H, Sebring R, Brown K, Balks E, Stirling C, Klaasen E, Hill R, Rippeke B, Ruby K, Alt D, Mukhopadhyay S, Kojima H, Johnson N, Rinckel L, Doelling V, Jones B. : Report on the international workshop on alternative methods for Leptospira vaccine potency testing: state of the science and the way forward., *Biologicals*, 41 (5), 279-94 (2013)
- 21) Onoue S, Hosoi K, Toda T, Takagi H, Osaki N, Matsumoto Y, Kawakami S, Wakuri S, Iwase Y, Yamamoto T, Nakamura K, Ohno Y, Kojima H : Intra-/inter-laboratory validation study on reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation using two different solar simulators., *Toxicology In Vitro*, 28(4), 515-523 (2013)
- 22) Kojima H: Update from the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), *Alternatives to Laboratory Animals*, 41(6), 435-441 (2013)
- 23) 小島 肇夫：技術講座 安全性評価試験 (27) 生殖毒性試験、COSME TECH JAPAN, 4(1) 70-74 (2014)
- 24) 小島 肇夫：技術講座 安全性評価試験 (28) 動物実験代替法を巡る動向2013年、COSME TECH JAPAN, 4(2) 36-42 (2014)
- 25) 小島 肇夫：動物実験代替法を用いた「これからの化粧品・医薬部外品の安全性評価とその根拠の示し方」、COSMETIC STAGE、8(3) 1-8 (2014)
2. 口頭発表
- 1) 小島 肇：シンポジウム8：*in vitro*を用いた創薬安全性評価とその外挿性、*in vitro*によるスクリーニング（総論）、第40回日本毒性学会 学術年会、2013年6月17-19日、幕張メッセ
- 2) 山口宏之、小島 肇、竹澤俊明：Vitrigel-EIT法：ヒト角膜上皮組織シート型培養モデルをもちいた高感度な*in vitro*眼刺激性試験、第40回日本毒性学会 学術年会、2013年6月17-19日、幕張メッセ
- 3) 川上哲、尾上誠良、松本康浩、戸田嗣人、大崎尚人、若栗忍、岩瀬裕美子、山本敏誠、高木広憲、中村和希、細井一弘、小島 肇：医薬品の光毒性ポテンシャル評価のためのROSアッセイバリデーション試験、第40回日本毒性学会 学術年会、2013年6月17-19日、幕張メッセ
- 4) 内野正、竹澤俊明、山下邦彦、小島 肇、清水久美子、秋山卓美、五十嵐良明：Vitrigel-EIT法：ヒト角膜上皮組織シート型培養モデルをもちいた高感度な*in vitro*眼刺激性試験、第40回日本毒性学会 学術年会、2013年6月17-19日、幕張メッセ
- 5) 小島 肇：日本での皮膚感作性代替法開発状況について、皮膚感作性試験ワークショップ、2013年7月12日、日本化学工業協会
- 6) Kojima H : Workshop: Alternative Test Methods and International Regulatory perspectives, JaCVAM: Recent Progress and Future Plans for the Validation and Acceptance of Alternative Testing in Japan, The XIII International Congress of Toxicology, June 30-July 4, 2013, COEX, Seoul, Korea
- 7) Morita T, Kojima H, Hayashi M : General Principles of Chemical Selection for *in vivo*, Validation Studies, The International Symposium of the Center of Alternative Methods for Safety Evaluation of Cosmetics, July 2, 2013, COEX, Seoul, Korea
- 8) Kojima H : Our Practical Examples of International Validation Studies for Establishing OECD Test Guidelines, The International Symposium of the

- Cneter of Alternative Methods for Safety Evaluation of Cosmetics, July 2, 2013, COEX, Seoul, Korea
- 9) 小島 肇：代替法の国内外の動向、皮膚基礎研究クラスターフォーラム、2013年8月1日、亀戸文化センター
 - 10) 小島 肇：動物実験代替法の国内外の動向と化粧品・医薬部外品の規制、日本化粧品技術者会大阪支部 勉強会、2013年8月30日、薬業年金会館
 - 11) 小島 肇：代替法の最新情報、動物実験についての知識を高めるための教育訓練 2013年9月11日、農研機構 中央農業総合研究センター
 - 12) Kojima H, Oshimura M, Saito K, Saito F and Imatanaka N : Japanese Project “ARCH-Tox” for the Future Chemicals Management Policy: Research and Development of *in vitro* and *in vivo* Assays for Internationally Leading Hazard Assessment and Test Methods, 15th Annual Congress of European Society for Alternative to Animal Testing, 2013年9月17日、リンツ (オーストリア)
 - 13) Kojima H, Stokes W, Horii I, Hwan K.B and Spielmann H, Peer Review Panel Evaluation of the ROS Photosafety Assay, 15th Annual Congress of European Society for Alternative to Animal Testing, 2013年9月15日、リンツ (オーストリア)
 - 14) 小島 肇：*in vitro*探索毒性試験の展望、日本薬物動態学会 第28回年会シンポジウム9、2013年10月10日、東京
 - 15) 小島 肇：三次元培養モデルの現状と可能性、株式会社ニコゲームリサーチ 創立10周年記念特別講演会
 - 16) 小島 肇：動物を用いないで医薬部外品の承認申請を取ることは可能か？、日皮協 会員研修会、2013年10月24日、京都
 - 17) Kojima H, Oshimura M and Imatanaka N : Japanese Project “ARCH-Tox” for alternative to 28-day repeated dose oral toxicity study), 10th annual Meeting of KSAAE (Korean Society of Alternative Animal Experiments), 2013年11月6日、韓国中央大学
 - 18) 小島 肇：昨今の皮膚毒性評価法の動向、安全性評価研究会 安全性評価研究会 2013年冬のセミナー、平成25年12月7日、住友ベークライト、東京
 - 19) 小島 肇：JaCVAM国際シンポジウム：日本動物実験代替法学会の活動、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
 - 20) 小島 肇：シンポジウム4：動物実験代替法の化粧品規制に関する現状、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
 - 21) 小島 肇：ランチョンセミナー：動物実験代替法開発における課題とカイコの可能性、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
 - 22) 内野 正、清水 久美子、竹澤 俊明、山下邦彦、小島 肇、秋山 卓美、五十嵐 良明：ピトリゲルチャンバーを用いた皮膚感作性試験代替モデル (下面暴露法)、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
 - 23) 木村 裕、藤村 千鶴、渡辺 美香、齋藤 るみ子、鈴木 紀之、岩城 知子、山影 康次、齋藤 幸一、中島 芳浩、近江谷 克裕、酒井 綾子、丸谷 あおい、大森 崇、山崎 晶次郎、小島 肇、田中 憲穂、相場 節也：IL-8 Luc assayの施設間差試験およびデータセットの作製、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
 - 24) 丸谷 あおい、相場 節也、木村 裕、渡辺 美香、鈴木 紀之、岩城 知子、山影 康次、齋藤 幸一、中島 芳浩、近江谷 克裕、山崎 晶次郎、小島 肇、田中 憲穂、小林真弓、森 梓、大森 崇：IL-8 Luc assayにおけるばらつきを考慮した班手基準の提案、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
 - 25) Kojima H, Stokes W, Horii I, Hwan K.B. and Spielmann H : Peer Review Panel of the Japanese validation study of the ROS *in vitro* phototoxicity

- for ICH、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 26) 加藤 義直、山本 直樹、佐藤 淳、中田 悟、小島 肇：不死化ヒト角膜上皮細胞株 (iHCE-NY) を用いた三次元角膜再構築モデルの作製、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 27) 古川 正敏、榊原 隆史、六川 潤美、伊藤浩太、佐々木 啓、平賀 武夫、小島 肇、松浦 正男：牛角膜を用いた混濁度および透過性試験法 (BCOP法) における被験物質の濃度および曝露時間の影響、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 28) 大森 崇、簾内 桃子、池田 英史、中村 香織、鄭 美淑、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 (II)、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 29) 小島 肇、Nicole Kleinstreuer、Chae-Hyung Lim、寒水 孝司、渡辺 美香、新妻 健、山下 邦彦、福田 隆之、山口 典子、藤原 聖、山口 宏、竹澤 俊明：Vitrigel-EIT (Eye Irritancy Test) 法のプレバリデーション研究、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 30) 成田和人、石原有人、小島 肇、板垣 宏：培養細胞を用いた試験における難水溶性物質の暴露方法の検討、日本動物実験代替法学会 第26回大会、平成25年12月19-21日、京都テルサ
- 31) 古川 正敏、榊原 隆史、六川 潤美、伊藤浩太、佐々木 啓、平賀 武夫、小島 肇、松浦 正男：牛角膜を用いた混濁度および透過性試験法 (BCOP法) における病理組織学的検査、第30回日本毒性病理学会総会および学術集会、平成26年1月30、31日、あわぎんホール (徳島)

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. 添付資料

- 1) Reactive Oxygen Species (ROS) assay to examine photoreactivity of chemicals
- 2) Peer Review Panel Evaluation of the Reactive Oxygen Species (ROS) Photosafety Assay

REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) ASSAY TO EXAMINE PHOTOREACTIVITY OF CHEMICALS

Issued by: ROS assay Validation Management Team

Date: 17 May 2013.

1. INTRODUCTION

The purpose of this document is to recommend protocol for reactive oxygen species (ROS) assay to examine photoreactivity of chemicals. Photoreactivity is defined as the property of chemicals that react with another molecule in consequence of photon absorption. Excitation of molecules by light can lead to generation of ROS including superoxide anion (SA) and singlet oxygen (SO) through energy transfer mechanisms. ROS assay is not a phototoxicity test but a physicochemical test similar to measurement of UV absorbance.

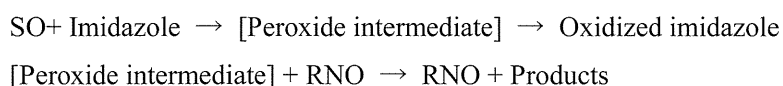
2. INITIAL CONSIDERATION

Validation studies conducted by JaCVAM showed that ROS assay has 100% sensitivity for predicting phototoxicants but a low specificity [1-3]. Based on the results of the validation studies, conducting this assay would classify a test chemical into one of 3 criterion; “Non-photoreactive”, “Weakly photoreactive” or “Photoreactive”. A “Non-photoreactive” result in this assay could predict as a non-phototoxic chemical, however, further examination on phototoxicity is necessary for “Weakly photoreactive” or “Photoreactive” result. When precipitation is found microscopically at 20 μ M (final concentration), it is inadvisable to evaluate the chemical. It is inadvisable to test chemicals exhibiting peak absorbance at 440 or 560 nm, which might interfere with the ROS assay.

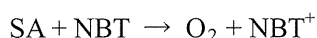
3. PRINCIPLE OF THE TEST METHOD

Drug-induced photoirritation can be defined as an inflammatory reaction of the skin after topical or systemic administration of pharmaceutical substances. Several classes of drugs including antibacterials, thiazide diuretics, non-steroidal anti-inflammatory drugs, quinolones, and tricyclic antidepressants, even though nontoxic by themselves, may become reactive under exposure to environmental light, leading to undesired side effects. The primary event in any photosensitization process is the absorption of photons of the appropriate wavelength, which allows chromophore to reach an excited state. The excitation energy is often transferred to oxygen molecules, followed by generation of ROS: SA through type I reaction and SO through type II reaction by photo-excited drug molecules. These appear to be the principal intermediate species in the phototoxic response. From the standpoint of risk assessment, previous study demonstrated that determination of ROS from pharmaceutical substances irradiated with UVA/B and visible light would be of help in recognizing their phototoxic potential.

In the ROS assay, the SO generation was detected by spectrophotometric measurement of *p*-nitrosodimethyl aniline (RNO) bleaching, followed by decreased absorbance of RNO at 440 nm [4]. Although SO does not react chemically with RNO, the RNO bleaching is a consequence of SO capture by the imidazole ring, resulting in the formation of a trans-annular peroxide intermediate capable of inducing the bleaching of RNO as follows;



The SA generation could be determined by the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) as indicated below; NBT can be reduced by SA via a one-electron transfer reaction, yielding partially reduced (2 e⁻) monoformazan (NBT⁺) as a stable intermediate [5]. Thus, SA can reduce NBT to NBT⁺, whose formation can be monitored spectrophotometrically at 560 nm.



4. DESCRIPTION OF THE TEST METHOD

Technical equipment

- Solar simulator: e.g. Suntest CP series (Atlas Material Technology, Chicago, IL, USA) or SXL-2500V2 (Seric, Tokyo, Japan) with a fan and UVC cut filter (spectrum are shown in Appendix 1)
- UVA detector: e.g. #0037 (Dr. Hönle, München, German) or UD series (Topcon, Tokyo, Japan)
- Quartz reaction container (Ozawa Science, Aichi, Japan, Appendix 2) or its equivalent

- Microplate spectrophotometer, equipped with 440 and 560 nm filters
- Microscope
- Thermometer
- Vortex mixer
- Plate shaker
- Sonicator
- Pipettes
- Polypropylene tubes
- Plastic 96-well plates (clear, non-treat flat-bottom)
- Plastic- and glassware

Solar simulator

Appropriate solar simulator irradiating UV and visible light should be used. The irradiation power distribution should be close to that of outdoor daylight by using an appropriate UVC cut filter. Recommended solar simulators and UVA intensity on the plate position measured by UVA detector #0037 (Dr. Hönle) are shown as follows;

- Suntest CPS+ or CPS (Atlas) with UV cut filter (<290 nm): 1.8 to 2.2 mW/cm² (e.g. the indicator setting value of 250 W/m² for CPS+) for 1 hour; 6.5 to 7.9 J/cm² of UVA intensity (Appendix 1)
- SXL-2500V2 (Seric) with UV cut filter (<300 nm): 3.0 to 5.0 mW/cm² for 1 hour; 11 to 18 J/cm² of UVA intensity (Appendix 1)

The solar simulator should be equipped with appropriate temperature control unit or fan to stabilize the temperature during irradiation because ROS production is influenced by temperature. When the solar simulator has a temperature control unit, the temperature will be adjusted at 25°C. Acceptable temperature range is 20 to 29°C during irradiation. When a different solar simulator is used, the reference chemical set listed in section 6 should be tested prior to the test. Values of singlet oxygen (SO) and superoxide anion (SA) should be close to the values mentioned in section 6.

Quartz reaction container

A quartz reaction container is used to avoid the loss of UV by passing through a plastic lid and vaporizing of reaction mixture [6]. The made-to-order container (Appendix 2), or its equivalent is recommended. If a different container is used, a lid or seal with high UV transmittance must be used. In this case, the feasibility study should be conducted using the reference chemicals to determine appropriate condition of UV/visible light exposure.

Reagents