

光毒性試験代替法バリデーション研究 報告書

2004年8月27日

光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会
委員長 吉村 功

1. はじめに

日本動物実験代替法学会代替法評価委員会（以下「評価委員会」という）は、2003年7月29日、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会（以下「バリデーション委員会」という）に、「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリー（以下「酵母-赤血球試験」）の施設間バリデーションを行うことを要請した。（別添え資料1「合同委員会議事録」を参照のこと。）

バリデーション委員会は、要請に応じるため、別添え資料2「光毒性試験代替法バリデーション研究試験計画書」（以下、計画書の添付資料も含めて「計画書」という）に述べるように、「光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会」（以下「実行委員会」という）を組織し、2003年10月16日に研究を開始した。

実行委員は、

板垣宏、大野泰雄、大森崇、岡本裕子、川端留美、小島肇夫、田中憲穂、土肥孝彰、
藤田百合子、穂谷昌利、森眞輝、吉村功（委員長）、若栗忍

の13人で、その所属等は計画書の添付資料の通りである。

実行委員会は、計画書にそって、2003年11月13,14日に食品薬品安全センター（秦野）で技術研修会を開催した。実験参加施設への機材送付等は、大野が2003年度末までに行った。実験参加施設は2003年中に実技復習を行い、2004年1月から4月中旬までの間に実験を終え、データを解析担当の大森に送付した。大森はデータクリーニング・解析を行った上、2004年5月7日の検討会に結果を報告した。

本報告書は、検討会後に補足されたことを含めて、研究全体の内容をまとめたものである。

2. 研究課題

本研究が解答を与えるべき主要課題は、酵母-赤血球試験の結果が施設間でどの程度変動するか、多施設試験を行って定量的に把握することである。副次課題は、提案されている酵母-赤血球試験の標準手順（standard operating procedure; SOP）の各指示、とりわけ陽性・陰性の判定法が適切かどうかを吟味することである。

3. 研究の遂行

研究はほぼ計画書にそって遂行された。

3-1) 実験施設

実験を行った施設は、公募に応じた次の6施設で、括弧内は実験担当者である。

(株)コーセー研究本部品質保証センター	(岡本裕子, 谷川浩子)
(株)資生堂安全性・分析センター	(森眞輝, 穂谷昌利)
(財)食品薬品安全センター秦野研究所	(若栗忍)
東洋ビューティ(株)中央研究所	(藤田百合子)
日本メナード化粧品(株)総合研究所	(長谷川靖司)
マルホ(株)京都R&Dセンター	(土肥孝彰)

3-2) 被験物質

被験物質は表1に示す16物質から、9物質を大野が選択しコード化した。

各施設には、表2中に○で示された6物質が、物質名及び光毒性の有無を隠して、酵母光生育阻害試験の陽性対照(8-Methoxypsoralen)、赤血球光溶血試験の陽性対照(Acridine)と共に配布された。

これらの物質名・施設名は2004年5月7日の検討会で明らかにされたが、本報告書では施設名をa,b,...,fというコードで表し、どのコードがどの施設であるかを示さないことにした。

以下では、「陽性」「positive; P」「+」を全く同じものとして、説明文では「陽性」を使い、表での省略形を「P」とする。「擬陽性」「equivocal; E」「+/-」や、「陰性」「negative; N」「-」についても同様である。

表1 被験物質候補となった16物質と *in vivo* での評価

物質名	<i>In vivo</i> 判定			物質名	<i>In vivo</i> 判定		
	本バリ デーショ ン採用の 評価	資生堂 評価(評 価点)	EU/ COLIPA 採用の評 価		本バリ デーショ ン採用の 評価	資生堂 評価 (評価 点)	EU/ COLIPA で採用さ れた評価
<u>Amiodarone</u>	P		P	4- <i>t</i> -Butyl-4-methoxydibenzoylmethane(BM DM)	N	N(0)	
Anthracene	P	P(1.8)	P	Musk ambrette	N	N(0.7)	N
Bithionol	N	N(0)	P	Piroxicam	N	N(0)	N
<u>Chlorhexidine(C HD)</u>	N		N	Rose bengal	N	N(0)	E
Chlorpromazine (CPZ)	P	P(1.6)	P	3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide(TCSA)	P	P(1.5)	
5-Methoxypsoralen(5-MOP)	P	P(2.7)	P	8-Methoxypsoralen(8-MOP)	P	P(4.8)	P
Sodium lauryl sulfate(SLS)				6-Methylcoumarin(6-MC)	N	N(0)	P
2-Ethylhexyl- <i>p</i> -dimethylaminobenzoate(EDA)	E	E(1.0)		Acridine	P	P(2.1)	P

注：資生堂の *in vivo* 判定はモルモットの結果、ECVAM, EU/COLIPA の判定はヒトの結果によっている。 *In vivo* 判定において、空白はデータなし、である。

資生堂判定についての文献：

- (1) Sugiyama, M., et al. (1994a) *In vitro* assays to predict phototoxicity of chemicals: (I) Red blood cell hemolysis assay. *Alternative to Animal Testing and Experimentation*, **2**, 183-191.
- (2) Sugiyama, M., Itagaki, H. and Kato, S. (1994b) *In vitro* assays to predict phototoxicity of chemicals: (II) Yeast growth inhibition assay and battery system with photohemolysis assay. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, **2**, 193-202.

EU/COLIPA の *in vivo* 判定についての文献：

- (1) Spielman H., et al. (1994) EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: first results obtained with a balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicology in Vitro*, **8(4)**, 793-796.
- (2) Spielman H., et al. (1998) The international EU/COLIPA *in vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial). part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology*

in Vitro, **12(3)**, pp. 305-327.

(3) Spielman H., et al. (2000) The second ECVAM workshop on phototoxicity testing. *Alternatives to Laboratory Animals*, **28(6)**, 777-814.

表2 選択した9被験物質と各施設への割り付け。○印が該当被験物質を割り当てた施設

被験物質名	コード	<i>in vivo</i> 判定	施設コード					
			a	b	c	d	e	f
Anthracene	A	P	○	○	○	○	×	×
Amiodarone	B	P	○	○	○	○	×	×
CHD	C	N	○	○	○	○	×	×
CPZ	D	P	○	○	×	×	○	○
Bithionol	E	N	○	○	×	×	○	○
SLS	F	N	○	○	×	×	○	○
Acridine	G	P	×	×	○	○	○	○
6-MC	H	N	×	×	○	○	○	○
BMDM	I	N	×	×	○	○	○	○

3-3) 光源

太陽光のシミュレーション光源については、6施設がそれぞれ1台のDr. Hönle社のSOL500を用いた。

3-4) 吸光度の波長

赤血球光溶血試験で光溶血度を測定する際の吸光度測定は波長540nmと525nmの2種類で実施したが、主解析を540nmフィルターの測定値に基づくことにした。525nmでの測定が測定機器の関係で困難なときは、520nmあるいは530nmで代用することを認めた。これについては後で考察する。

3-5) 実験条件の記録

GLP準拠で実験することにしたので、すべての実験施設が、そこで定められている測定機器や実験条件などの記録のコピーを大野に送付した。

4. 実験データの管理と解析

4-1) データ量

実験で得られたデータは各施設から、大森と吉村に送られた。

そのファイル数は、本実験と予備実験をあわせて、酵母光生育阻害試験が228、赤血球光溶血試験が192であった。データ解析は大森が担当した。前記検討会に提出された資料、及びその後の追加資料は別添え資料3「データ解析報告書」の通りである。以下の説明はこの報告書を要約したものであるから、詳細についてはこの報告書で確かめることができる。

4-2) データクリーニング

大森は、各施設から送られたデータを吟味し、酵母光生育阻害試験の39ファイル、赤血球光溶血試験の183ファイルについて、生じた疑問点を問い合わせ、必要な修正を行った。その内容は

- (1) 必要なデータが入力されていない (16件),
- (2) 規定したフォーマット形式にデータが入力されていない (1件),

- (3) プロトコルや事前に決められたルールに適合していない (48 件),
- (4) 単純な入力ミス (6 件),
- (5) 試験実施施設からの誤りであるとの報告 (3 件),
- (6) 紙媒体で提出されたデータと電子媒体で送られてきた結果が一致しない (54 件),
- (7) その他 (94 件)

であった。

データクリーニングを行ってデータを固定した後、被験物質コードが大野より大森に開示された。施設コードと被験物質コードが実行委員会に開示されたのは、2004 年 5 月 7 日検討会である。

4-3) 結果の判定規則

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験のそれぞれの SOP にもとづいて、各試験で 2 回の本実験が行なわれた。2 回の結果が大きく異なった場合は追加実験が 1 回行なわれているので、本実験の中で追加実験結果に近い方を当該試験での評価結果とした。

本研究の結果判定としては、表 3 に示すように、2 試験のどちらかで陽性と判定された被験物質を光毒性「陽性」、擬陽性と陰性の組み合わせになった被験物質を光毒性「擬陽性」、両試験で陰性と判定された被験物質を光毒性「陰性」とした。

表 3 二つの試験からの総合判定の規則

		赤血球光溶血試験		
		陽性	擬陽性	陰性
酵母光生育 阻害試験	陽性	陽性	陽性	陽性
	擬陽性	陽性	擬陽性	擬陽性
	陰性	陽性	擬陽性	陰性

4-4) 施設内再現性

本研究の主要課題は施設間再現性の検討であるが、施設内で再現性がなければ施設間再現性の吟味が無意味になる。そこでまず施設内再現性を吟味した。

すなわち、本実験の 2 回の結果を、1 回ずつ別々の 2 試験とした組み合わせについて、2 回の判定結果が同じかどうかを調べた。その結果、表 4 に示した場合には、実験を反復したときに異なる結果が生じる可能性があることが分かった。

施設 b で特に再現性が悪かった理由について検討したところ、施設 b では、実験器具の関係で、実験者の使い慣れた実験室ではなく、他施設を借用して実験を行っていた。そのため、例えば光照射による温度変動を制御するのが困難という条件が生じていた。これによって結果が不安定となり、他の実験施設と異なる結果を導いたものと思われる。次項で施設間差を評価するときは、これを考慮に入れて検討を行う。

施設 c の物質 H については、赤血球光溶血試験で 1 回目と 2 回目が大きく異なった結果が得られたためであるが、追加実験でこれが補正されているので次項の検討には影響しないと考えられる。施設 c の物質 B については、結果としての陰性と擬陽性の違いはあるが、測定値としては、それほど大きな差ではないので、酵母-赤血球試験にある程度の施設内再現性が認められたものとして施設間再現性を検討する。

表 4 施設内の実験反復で結果が異なる可能性のある施設・被験物質組み合わせ

施設	被験物質	可能性
b	A	E または P
	B	N または E
	C	E または P
	D	N または E または P
	F	N または P
c	B	N または E
	H	N または P

4-5) 施設間再現性および *in vivo* 判定との類似性

酵母-赤血球試験による判定結果をまとめると表5が得られる。施設bを除いて考えると、陽性と陰性が混在する物質はない。物質A, B, Dで陽性と擬陽性が混在、物質Hで陰性と擬陽性が混在している。この擬陽性をどう考えるかが、施設間再現性の評価を左右する。

これについて実行委員会では、後で考察するように、カットオフ値の変更と用量相関性を考慮に入れた判定が必要であるという意見が出たが、これによって十分な再現性があるという結論には至らなかった。

この結果を *in vivo* 判定と比べると、表6-1, 6-2が得られる。前者は施設bを除いた場合、後者は施設bを含めた場合である。

表6-1,2において採用している指標の定義は次の通りである。

感度 I: 陽性物質を陽性と判定した割合

感度 II: 陽性物質を陽性または擬陽性と判定した割合

特異度: 陰性物質を陰性と判定した割合

一致度 I: *In vivo* 判定と実験判定が一致した割合

一致度 II: 擬陽性判定を陽性判定とみなしたときに *in vivo* 判定と実験判定が一致した割合

表6-1,2においては、感度IIがかなり大きな値であるのに、特異度は小さな値であることが目立っている。その主たる原因は、物質C, Hの *in vivo* 判定が陰性なのに、実験判定のほとんどが陽性または擬陽性であることである。

まず物質Cの *in vivo* 判定の根拠を表1で見ると、ここでは判定が文献によるものであって実験値が明瞭には示されていない。この判定の妥当性の再検討が必要である。

次に物質Hの実験データを見ると、擬陽性を示した3施設の全てにおいて、酵母光生育阻害試験での反応が、カットオフ値ぎりぎり擬陽性になっている。従って、現在設定されているカットオフ値の妥当性の再検討が必要である。

表5 施設間再現性 (P: 陽性, E: 擬陽性, N: 陰性)

被験物質	コード	<i>In vivo</i> 判定	施設					
			a	b	c	d	e	f
Anthracene	A	P	P	E	E	P		
Amiodarone	B	P	P	N	P	E		
CHD	C	N	P	P	P	P		
CPZ	D	P	P	E			E	P
Bithionol	E	N	P	P			P	P
SLS	F	N	N	P			N	N
Acridine	G	P			P	P	P	P
6-MC	H	N			N	E	E	E
BMDM	I	N			N	N	N	N

表6-1 *In vivo* 判定に対する実験判定の類似性 (施設bを除いた場合)

	施設コード					平均
	a	c	d	e	f	
感度 I	3/3 (100%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)	10/13 (77%)
感度 II	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	13/13 (100%)
特異度	1/3 (33%)	2/3 (67%)	1/3 (33%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)	8/17 (47%)
一致度 I	4/6 (67%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	4/6 (67%)	18/30 (60%)
一致度 II	4/6 (67%)	5/6 (87%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	21/30 (70%)

表 6-2 *In vivo* 判定に対する実験判定の類似性 (施設 b を含めた場合)

	施設コード						平均
	a	b	c	d	e	f	
感度 I	3/3 (100%)	0/3 (0%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)	10/16 (63%)
感度 II	3/3 (100%)	2/3 (67%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	15/16 (94%)
特異度	1/3 (33%)	0/3 (00%)	2/3 (67%)	1/3 (33%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)	8/20 (40%)
一致度 I	4/6 (67%)	0/6 (0%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	4/6 (67%)	18/36 (50%)
一致度 II	4/6 (67%)	2/6 (33%)	5/6 (83%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	23/36 (64%)

5. 考察

5-1) 各被験物質の実験結果の特徴

個々の実験での判定について解析者がまとめた特徴は表 7 の通りである。それぞれ注意点があるので、SOP の改訂や今後のバリデーション研究での被験物質選択において参考にすべきと思われる。

赤血球光溶血試験では、陽性対照が陽性にならないという現象がいくつかの施設で見られた。穂谷がその原因を調べたところでは、当初予定していた Veronal buffer と Sigma 社製 acridine をそれぞれ PBS(-) と東京化成社製 acridine に変更したことが影響し合ったため、前者で用意した SOP のままでは、光溶血性反応が不十分になる例が生じたためのものである。

これについては更に検討を進め、SOP の改訂に反映させるべきであろう。

表 7 データに表れた被験物質の特徴

	酵母光生育阻害試験	赤血球光溶血試験 (540nm)	<i>In vivo</i>
物質 A	・施設 a での差がやや大 ・施設 b のばらつき大	・施設 d の陽性という判定はカットオフ値ぎりぎり	・陽性
物質 B	・施設 a,c,d では用量反応があるが、施設 b では傾向がない	・全施設で用量反応がない	・陽性
物質 C	・照射・非照射で用量反応あるが差では用量反応が不明確	・全施設で陽性 ・非照射でも用量反応あり ・施設 b での再現性が無い	・陰性
物質 D	・照射・非照射で用量反応あり ・施設 a で照射・非照射の差がやや大	・施設 a,b,e で非照射の溶血度が大きい ・全施設で非照射での用量反応があり、照射に対する関係が複雑	・陽性
物質 E	・施設 a で差が大 ・差の用量反応は不明確	・全施設で明確に陽性 ・非照射でもやや反応あり	・(資)陰性、 (E/C)陽性
物質 F	・全施設で用量反応ない	・施設 b のばらつき大	・陰性
物質 G	・全施設で判定が微妙 ・非照射でもやや反応あり	・全施設で陽性 ・非照射での反応がほとんどない	・陽性
物質 H	・全施設で判定が微妙	・全施設で反応がほとんどない ・施設 c は再実験で陰性	・(資)陰性、 (E/C)陽性
物質 I	・全施設で用量反応ない	・全施設で用量反応ない	・陰性

(資)：資生堂、(E/C)：EU/COLIPA

5-2) SOP

本研究では、本試験に先立って、SOP への修正提案が実験担当者などから出された。提案の内に示すものは、担当の森、穂谷の検討の後で、SOP の改訂や追加説明に取り入れられた。

- (1) 両試験とも、当初の SOP では、データの記入方法の詳細が明確でなかった。本研究の際には記録用紙のフォーマットを更新した。
- (2) 酵母光生育阻害試験では阻止帯の境界線が不明確な場合が生じた。このような場合の測定方法

について SOP の記載を改めた。

提案の内、次に示すものは、今後の SOP 改訂の際に検討すべきことであり、酵母-赤血球試験の評価を行うときは、これについての検討が必要と思われる。

- (3) 用量設定試験や本試験の設定のやり方を SOP に記載すべきである。(注:1月に対応済み。)
- (4) 溶媒選択の方法と理由について、方針を SOP に説明しておくべきである。(注:1月に対応済み。)
- (5) 今回は被験物質を4倍希釈系列で実験したが、この倍率設定の妥当性を検討すべきである。
- (6) 試験の繰り返しの基準を明確にする必要がある。
- (7) 酵母光生育阻害試験では、酵母含有プレートに試薬を含ませたる紙を着装した後の UV 照射までの時間、すなわち寒天培地中への拡散のための時間の設定を SOP に記載することが望ましい。
- (8) 酵母光生育阻害試験では、照射後、試験期間終了まで、ろ紙をそのままにしておくのか、それとも除去するのか明確にすべきである。すなわち、検体の曝露時間を明確にすることが必要である。
- (9) 赤血球光溶血試験では、24穴マイクロプレートから96穴マイクロプレートに移すときの割付方法を SOP に図入りで示しておくことが望ましい。
- (10) 両試験とも SOP が手順の順に書かれていないので、SOP にフローチャートを挿入しておくことが望ましい。(注:1月に対応済み。)
- (11) 両試験とも光照射の有無による結果のみを求めるようになっているが、酵母光生育阻害試験では阻止帯の径を、赤血球光溶血試験では溶血度を測定値として記録し、用量反応を確認する判定を検討すべきである。

5-3) 判定のカットオフ値

酵母光生育阻害試験では阻止帯の径の差、赤血球光溶血試験では溶血度の差に、陽性・陰性のカットオフ値が定められている。本研究での実験結果によると、後者については SOP での値を変更する必要が感じられなかったが、前者については再検討の必要性が感じられた。

すなわち、酵母光生育阻害試験の判定基準が、以前の論文では2mmであったものが、今回は光源の変更に伴い一致率を高めるためということで5mmとされた。そこで今回の実験では、阻止帯の径差が2mm以上5mm未満の場合を擬陽性としたが、実験結果を見ると、阻止帯のカットオフ値を、例えば3mm~4mmに変更することで施設間再現性が良くなる。酵母光生育阻害試験については、カットオフ値を再検討すべきであろう。

一般に試験法の結果判定では、陽性対照が明確に陽性を示すことが前提になる。それなのに本研究で、各施設から得られた陽性対照の値は、今回設定のカットオフ値5mm付近に密集していた。これは、カットオフ値の再検討が必要であることを示している。

なお、両試験とも光照射の有無における差に対してカットオフ値を設定し、陽性・陰性を判定しているが、酵母光生育阻害試験では阻止帯の径を、赤血球光溶血試験では溶血度を反応値として用量反応を確認し、これも判定に利用する判定方法も検討すべきであろう。

5-4) *In vivo* 判定の妥当性

表1の陽性・陰性等の判定において、資生堂の方はモルモットについての測定値によっているが、ECVAM等の方は文献から結果のみを引用したものであり、その根拠となるデータは入手できなかった。被験物質 C (Chlorhexidine) の酵母-赤血球試験では、全施設で明確な陽性が見られたにもかかわらず、*in vivo* 判定が逆だったことは *in vivo* 判定の根拠の再確認の必要性を示している。

一致度は *in vivo* 判定を基準にしているので、*in vivo* 判定で擬陽性を考えないで、一致度を評価するときは、実験判定での擬陽性をどちらかに含めるべきであろう。感度と一致度で2種類の指標を検討したのはそのためである。

5-5) バッテリーの役割

二つの試験を総合して判定する規則は表3に示したように、陽性>擬陽性>陰性の順で強い判定の方を採用することになっている。この規則では、先に試験をすることになっている酵母光生育阻害試験で陽性であれば、もう1つの試験はする必要がないが、本研究では、相互関係を確かめることもあって、全ての場合について両方の試験を行うことにした。

結果として、赤血球光溶血試験が必要でなかったかどうかを調べると、表8が得られる。表中で()で囲んであるのが不要だった実験で、太字で示したものが酵母光生育阻害試験の結果を総合判定で変更させた実験である。36実験中14実験で、バッテリーでの判定が酵母光生育阻害試験単独と変わっている。両者の組み合わせであることが大きな意味を持っていると言える。

表8 二つの試験の役割 (P: 陽性, G: 擬陽性, N: 陰性)

物質	施設	酵母	赤血球	総合	物質	施設	酵母	赤血球	総合	物質	施設	酵母	赤血球	総合
A	a	P	(E)	P	B	a	P	(N)	P	C	a	E	P	P
	b	E	E	E		b	N	N	N		b	N	P	P
	c	E	N	E		c	P	(N)	P		c	N	P	P
	d	E	P	P		d	E	N	E		d	N	P	P
D	a	P	(P)	P	E	a	P	(P)	P	F	a	N	N	N
	b	N	E	E		b	E	P	P		b	N	P	P
	e	E	N	E		e	E	P	P		e	N	N	N
	f	N	P	P		f	E	P	P		f	N	N	N
E	c	P	(P)	P	H	c	N	N	N	I	c	N	N	N
	d	E	P	P		d	E	N	E		d	N	N	N
	e	E	P	P		e	E	N	E		e	N	N	N
	f	E	P	P		f	E	N	E		f	N	N	N

5-6) 吸光度の測定波長

本研究では、吸光度の測定波長を540nmにすることを標準にしたが、同時に525nm前後の波長でも測定を行った。両者の結果を比較すると、表9が得られる。わずかではあるが、525nm前後で判定の方が感度、一致度の両面で良い結果を与えている。評価の際には、どちらの波長を標準にするかの判断が必要と思われる。

表9 *In vivo* 判定との類似性の吸光度測定波長による違い

左: 赤血球光溶血試験での吸光度を540nmで評価, 右: 525nmで評価 (単位は%)

感度 I: 陽性物質を陽性と判定した割合, 感度 II: 陽性物質を陽性または擬陽性と判定した割合, 特異度: 陰性物質を陰性と判定した割合, 一致度: 判定結果が *in vivo* の結果と一致した割合

	施設コード						平均
	a	b	c	d	e	F	
感度 I	100	0	67	67	50	100	63.9
感度 II	100	67	100	100	100	100	94.4
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致度	67	0	67	50	50	67	50.0
一致度 II	67	33	83	67	67	67	64.0

	施設コード						平均
	a	b	c	d	e	f	
感度 I	100	67	67	67	100	100	83.3
感度 II	100	67	100	100	100	100	94.4
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致度	67	33	67	50	67	67	58.3
一致度 II	67	33	83	67	83	67	77.8

5-7) SOP 逸脱例

赤血球光溶血試験で SOP から次のような逸脱例が生じたので、その取り扱いを大森、小島、吉村で検討し、以下に示す対処を行った。

(1) 24穴プレートから96穴プレートに分ける際に、実施が2系列でなされなかった。

=> 分けるのは測定のためなので、このデータを本研究のデータとして採用した。

(2) 予備試験と本試験 1 回目の陽性対照に、自施設で購入したものをを用いたので訂正のために実験を 2 回追加した。

=> 2 回目と 3 回目の測定値を採用した。

(3) 被験物質の濃度設定を誤ったので、新たに 2 実験を行った。

=> 追加した 2 実験のデータを採用した。

(4) 1 回目と 2 回目が大きく食い違ったので、実験を 2 回追加した。

=> 3 回目までのデータを採用した。

5-8) 将来のバリデーション研究における留意点

実験参加者から、将来のバリデーション研究で留意すべきこととして、以下の指摘が出された。

(1) 酵母光生育阻害試験では、判定に個人差がどれくらい影響するかを検討すべきである。

(2) 光毒性試験の施設間変動を調べるバリデーション研究の場合、実験装置のみでなく、実験室の広さや採光・遮光の条件を事前に明確にしておくべきである。

(3) 光毒性については、今回の使用したものとは異なる光源を用いた場合に結果がどのように変わるか検討すべきである。

(4) 今回の研究では、SOP で光源とフィルターを指定したが、試験法を一般化するときは光源を特定の機器にするのではなく、機器の性能で指定する方が望ましい。その条件を検討すべきである。

(5) 今回は、施設 b で実験施設上の問題が生じ、研究結果の解釈にあいまいさを残した。また、陽性対照が確かに陽性反応を示さなかったり、GLP 遵守が不十分であったりした例も現れた。今後のバリデーション研究では、技術研修の後で試用試験を行い、実験設備・試薬・技術・SOP の妥当性を再確認し、改善・対処を行うべきである。

(6) 結果論であるが、被験物質 C の *in vivo* 判定の妥当性が本研究の大きな焦点となった。今後の研究では、事前に *in vivo* 判定の根拠を調べ、それが十分でない物質は被験物質に含めないことが必要である。

6. 本研究のまとめ

6-1) 酵母-赤血球試験の妥当性

本研究の結果が表 6-1 にまとめられたとすると、感度 II が 100%、特異度が 47%、というのが一応の実験結果である。擬陽性を陽性とすれば、陽性物質を誤って陰性といわないという意味で、酵母-赤血球試験の有用性が示されたことになる。

6-2) 施設間差

実験条件に問題があった施設 b を除けば、施設間の違いは陽性と擬陽性、擬陽性と陰性の範囲に収まっていた。

6-3) カットオフ値

赤血球光溶血試験のカットオフ値については特に目立った問題は見られなかったが、酵母光生育阻害試験のカットオフ値には再検討の余地が見出された。これを適切に定めることによって感度を高めることができるかもしれない。

6-4) 吸光度の測定波長

実験結果によれば、540nm より 525nm 前後の波長帯を用いる方が良かったので、SOP でも波長を 525nm に変更することを検討すべきである。

6-5) 判定方法の改善

2 回の実験の再現性吟味と、酵母-赤血球試験での総合判定には用量反応関係を利用する方が良いと思われる。特に非照射下での結果に用量反応関係がある場合は慎重な判定を行うべきである。

6-6) GLP 遵守

かなり大幅なデータクリーニングが必要であった。GLP 遵守を徹底すべきである。

別添え資料

1. 合同委員会議事録
2. 「光毒性試験代替法バリデーション研究試験計画書」(添付資料一式)
3. 「データ解析報告書」(一式)