

光毒性試験代替法バリデーション研究 報告書

2008年1月7日

光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会、
及び、酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会
委員長 吉村 功

1. 経緯

日本動物実験代替法学会評価委員会（評価委員会）は、2003年7月、「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」（酵母-赤血球試験）の施設間差がどの程度であるか検討することを、日本動物実験代替法学会会長（学会会長）を經由して日本動物実験代替法学会バリデーション委員会（バリデーション委員会）に要請した。

バリデーション委員会は、光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会（主実験実行委員会）を組織し、2003年9月に研究を開始した。研究結果は2004年8月に主実験実行委員会からバリデーション委員会に、さらにバリデーション委員会から学会会長を經由して評価委員会に提出された。評価委員会は、この報告書を検討して、酵母光生育阻害試験の標準試験手順（standard operating procedure; SOP）に改善の余地があるという評価を行い、2006年6月、補完実験を通してSOP改訂を行うことを、学会会長を經由してバリデーション委員会に要請した。

バリデーション委員会は、2006年7月、新たに酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会（補完実験実行委員会）を組織して補完実験を開始した。研究結果は2006年12月にバリデーション委員会に報告され、さらに学会会長を經由して評価委員会に提出された。

評価委員会は、2007年1月に報告書を検討し、両報告書をまとめた報告書の作成を両実行委員会の委員長であった吉村に要請した。本報告書は、この要請の下で、両報告書提出後に補足された議論も含めて、バリデーション研究全体をまとめたものである。

2. 研究課題

本研究が結論を提出すべき主要課題は、酵母-赤血球試験の結果が施設間でどの程度変動するかを、多施設試験を行って把握することであり、副次課題は、多施設試験を行って試験結果の再現性を改善するSOP改訂の提案を行うことである。

3. 研究の遂行

研究は、施設間差に焦点を合わせて実験行ってその結果を総括したもの（主実験）と、SOP改訂の影響を確かめることに焦点を合わせて実験を行ってその結果を総括したもの（補完実験）の、2つに分けて行われた（資料1~4を参照）。

3-1) 実験参加施設

3-1-1) 主実験

実験を行ったのは、公募に応募した次の6施設である。

(株)コーセー研究本部品質保証センター

(株)資生堂安全性・分析センター

(財)食品薬品安全センター秦野研究所

東洋ビューティ(株)中央研究所

日本メナード化粧品(株)総合研究所

マルホ(株)京都R&Dセンター

3-1-2) 補完実験

実験を行ったのは、上記6施設の内から実験参加が不可能になった1施設を除いた、次の5施設

設である。新たな施設公募を行わなかったのは、後で述べるように、光生育阻害試験については補完実験を行わず、主実験の結果を利用することにしたためである。

- (株)コーセー研究本部品質保証センター
- (株)資生堂安全性・分析センター
- (財)食品薬品安全センター秦野研究所
- 日本メナード化粧品(株)総合研究所
- マルホ(株)京都 R&D センター

3-2) 実験

3-2-1) 主実験

各施設は、提案されている酵母-赤血球試験の SOP に従って、指定された被験物質の光毒性を実験的に評価した。ただし、予備実験において発生した疑義に応じて SOP の補足が行われたので、最終的に用いられた SOP は資料 5 に示すものである。

3-2-2) 補完実験

SOP が問題になった試験は、酵母光生育阻害試験だけで、赤血球光溶血試験は SOP を変えることを求められなかった。実験の負担を考慮して、補完実験は酵母光生育阻害試験のみで実験をすることにした。

しかし、酵母-赤血球試験では、表 1 に示すように、二つの試験の結果を合わせて評価を行うので、赤血球光溶血試験については主実験の結果を使うことにした。その結果、参加施設を、主実験を行った施設に限ることになり、結果として、実験施設は 5 施設となった。補完実験で採用した酵母光生育阻害試験の SOP は資料 6 に示すものである。

表 1 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

3-3) 被験物質

3-3-1) 主実験

被験物質は、表 2 に示す 16 物質から 9 物質を試料準備担当者が選択し、表 3 に○で示した 6 物質を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、各施設に配布した。

施設名は a, b, ..., f というコードで表しておき、データ解析が終了した後に明示した。

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 2 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-me thoxydibenzoy lmethane(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
Chlorhexidine(C HD)	N		N	Rose Bengal	N	N(0)	E
Chlorpromazine (CPZ)	P	P(1.6)	P	3,3',4',5-Tetra chlorosalicylan ilide(TCSA)	P	P(1.5)	
5-Methoxypsora len(5-MOP)	P	P(2.7)	P	8-Methoxypsor alen(8-MOP)	P	P(4.8)	P
Sodium lauryl sulfate(SLS)				6-Methylcoum arin(6-MC)	N	N(0)	P
2-Ethylhexyl- <i>p</i> - dimethylaminob enzoate(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つていいる。 *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3 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	○	○	○	○	×	×
<u>Amiodarone</u>	B	P	○	○	○	○	×	×
CHD	C	N	○	○	○	○	×	×
CPZ	D	P	○	○	×	×	○	○
Bithionol	E	N	○	○	×	×	○	○
SLS	F	N	○	○	×	×	○	○
Acridine	G	P	×	×	○	○	○	○
6-MC	H	N	×	×	○	○	○	○

BMDM	I	N	×	×	○	○	○	○
------	---	---	---	---	---	---	---	---

3-3-2) 補完実験

実験を酵母光阻害試験のみで行うという制約から、被験物質とその割り当ては主実験と同じものにした。その内容は表4の通りで、主実験と違うのは施設bが無いことだけである。試料コードは、予測可能性を小さくするために、主実験と異なるものにした。

表4. 各施設に割り付けた物質 (○印)

被験物質名	コード	in vivo 判定	施設コード				
			a	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	×	○	○	○	○

3-4) 光源と強度計

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

3-4-1) 主実験での補正

強度計に機差が認められたので、各施設で標準計にあわせた換算係数をかけて強度の補正をおこなった。換算係数は、各施設で記録されている。

3-4-2) 補完実験での強度計の補正

強度計の校正を2006年7月に行ったところ、標準としている強度計と大きく異なった値を示すものが2台あったので、この2台の施設には、標準としている強度計を送って自施設の実験の際に再度校正を行って換算係数を定め、実験を行うこととした。その換算係数は各施設で記録されている。

3-5) 吸光度の測定波長

主実験における赤血球光溶血試験では、光溶血度についての吸光度を、測定波長540nmと525nmの2種類で実施し、主解析を540nmでの測定値とした。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。

赤血球光溶血試験は主実験のみで行ない、補完実験では主実験のデータを利用した。

3-6) 実験条件の記録

主実験と補完実験の両方とも、GLP準拠で実験し、すべての実験施設が定められた様式で、指定された測定機器や実験条件などを記録した。

4. 実験データの管理と解析

4-1) データクリーニング

4-1-1) 主実験

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 39 ファイル、赤血球光溶血試験 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。その内容は以下の通りである。

- (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)

SOP では、各試験で 2 回の本実験を行ない、2 回の結果が大きく異なった場合は追加実験を 1 回行なうことになっていた。追加実験が行われた場合は、本実験の中の追加実験と結果が類似している方を採用して 2 回の実験結果とした。追加実験を 2 回行っている場合は、先に行った方を 1 回の追加実験とした。

被験物質コードは、データクリーニングを行ってデータが固定された後に被験物質割付担当者からデータ解析担当者に開示された。実行委員会に施設コードと被験物質コードが開示されたのは、2004 年 5 月の検討会である。

4-1-2) 補完実験

主実験の経験を生かして、データシートを改善した結果、クリーニングが必要なデータファイル数は、わずか 2 件に減少した。いずれも、データシートへの転記ミスである。

4-2) 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。

4-2-1) 主実験

本実験の 2 回の結果を、1 回ずつの 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 5 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 は特に結果が悪かった。その原因を検討したところ、実験者が使用機器に慣れておらず、例えば光照射による温度変動を制御していなかったことが分かった。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た。次項で施設間差を評価するときは、これを考慮に入れた検討を行うこととした。

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ていたが、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した。

表 5 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

4-2-2) 補完実験

主実験と同様、平均値ではなく、個別の測定値を用いて施設内再現性を評価した。追加実験をした場合には酵母-赤血球試験で使わないことになっている本実験の測定値も、施設内再現性の評価には用いることにした。この特殊な取り扱いによる判定での（陽性、擬陽性、陰性）を平均値での判定によるものと区別するために、前者を（+、+/-、-）と表記し、後者を（P、G、N）と表記することにした。

この表記を用いると、陽性対照については2回の判定がすべての施設で(++)であり、9被験物質については表6の場合に施設内で判定の違いが生じていた。補完実験での施設内再現性は明らかに主実験より良くなっている。SOPの改訂で施設内再現性が改善されたと考えられる。

表6 施設内で異なる結果が出た場合

		被験物質	可能性
施設	c	H	+/- or +
	d	B	+/- or +
	f	F	+/- or +

4-3) 施設間再現性および *in vivo* 判定との類似性

4-3-1) 主実験

酵母-赤血球試験による判定結果をまとめると表7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。

実行委員会では、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、これを考慮することによる再現性の改善は認められなかった。

この結果を *in vivo* 判定と比べると、表8-1、8-2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8-1、8-2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8-1、8-2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2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と思われた。

表7 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 8-1 *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 8-2 *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%)

4-3-2) 補完実験

表 9 は施設間再現性の検討結果を要約したものであり、表 10 は *in vivo* の結果との類似性を評価したものである。採用している指標は上と同じであるが、感度 I と感度 II の値が同じだったので、一致度については両者を区別しなかった。

SOP 改訂の結果、感度は高くなったが、特異度は低くなり、結果として一致度の改善は実現しなかった。

表 9 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	c	d	e	f
アントラセン	A	P	P	P	P		
アミオダロン	B	P	P	P	P		
クロルヘキシジン	C	N	P	P	P		
クロルプロマジン	D	P	P			P	P
ピチオノール	E	N	P			P	P
SLS	F	N	N			N	E
アクリジン	G	P		P	P	P	P
6-メチルケマリン	H	N		E	N	P	P
Parsol 1789	I	N		N	N	N	N

表 10 *In vivo* 判定に対する実験判定の類似性 (540nm)

	施設コード					平均
	A	c	d	e	f	
感度 I	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	103/13 (100%)
感度 II	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	13/13 (100%)
特異度	1/3 (33%)	1/3 (33%)	2/3 (67%)	2/4 (50%)	1/4 (25%)	8/17 (42%)
一致度	4/6 (67%)	4/6 (67%)	5/6 (83%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	18/30 (60%)

5. 考察

5-1) 各被験物質の実験結果の特徴

5-1-1) 主実験

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 11 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であろう。

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。その原因は、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 に変更したことの影響と考えられた。前者に基づいて作成した SOP では、光溶血性反応が不十分になる例が生じたためと考えられた。SOP を設定するとき、陽性対照をどのように使うかについて、十分な吟味が必要である。

表 11 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

5-1-2) 補完実験

SOP 改訂は、陽性対照を確実に陽性対照と判定することに焦点を合わせて行われた。その結果、すべての施設で陽性対照が陽性判定となった。改訂の妥当性が確認できたと考えられる。しかしこのことは、阻止帯の長さをより長い方に伸ばすことになったため、阻止帯の差のばらつきを大きくする傾向を生み出し、結果として施設間で大きなばらつきを生じさせたと考えられる。

5-2) SOP の改訂について

5-2-1) 主実験

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。提案の内に次に示すものは、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。
- (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。
- (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。
- (11) 両試験とも光照射の有無による結果のみを求めているが、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。

5-2-2) 補完実験

物質 A (アントラセン) や物質 B (アミオダロン) などの陽性物質では施設間差がみられたが、陰性と判定された物質には、大きな施設間差がみられなかった。SOP 改訂が、陽性判定をより明確に出そうとしたものであったため、阻止帯の差のばらつきを大きくしたと考えられる。

中間報告会の討論において、実験担当者から阻止帯の測り方について疑問が出た。プレートの底まで円が貫通しているものと表面だけに円が見られるものがあったためである。報告会の後で試験法の提案者で検討を行ってもらい、表面だけでもよいという結論が提出された。その結果として、SOP の該当部分に測定法の改訂が行われた(資料 7)。

物質 E (ピチオノール)、物質 F (SLS)、物質 H (6-メチルクマリン) は施設によって酵母試験の判定が異なったが、阻止帯の差の値に極端に大きな違いはなかった。改訂 SOP の下でも、酵母試験は、これら 3 物質で得られた程度の施設間差がある試験法と考えられる。

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。

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 1 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 12 が得られる。表中で () で囲んであるのが赤血球光溶血試験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。

しかし、これは両者のどちらを先にするかは無関係である。施設での作業のしやすさの関係で赤血球光溶血試験を先に行っても差し支えないことを、SOP に明記しておくべきであろう。

表 12 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

赤血球光溶血試験の SOP では、吸光度の測定波長を 540nm にすることを標準にしていたが、表 13 に示されているように、525nm 前後での判定の方が感度、一致度の両面で良い結果を与えている。どちらの波長を標準にするかについて適切な SOP 改訂が必要である。

表 13 *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。逸脱を生じさせないような技術研修での注意をすべきである。

- (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) 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しておくべきである。
- (2) 光毒性については、今回の使用したものと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。
- (3) 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。
- (4) 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

補完実験で用意した SOP による実験結果は、感度が 100%、特異度が 42%、一致度 60%であった。SOP 改訂によって、前研究では擬陽性領域にあった物質に陽性判定が下されたためである。擬陽性を陽性とすれば、陽性物質を誤って陰性とするのが少ないという意味で、酵母-赤血球試験の有用性が示されたことになる。

SOP 改訂により、陽性対照の判定はすべての施設で陽性判定となった。この面では SOP 改訂は妥当であったと考えられる。

6-2) 施設間差

実験技術に問題があって施設を除けば、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。補完実験で用意した SOP を用いたときの施設間差は小さいと思われる。

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 では波長を 525nm に変更することを検討すべきである。

6-5) データマネジメント

主実験では大幅なデータクリーニングが必要であったが、記入書式等を改善した補完実験では修正すべきところのごくわずかになった。

6-6) SOP 改訂の影響

陽性物質の阻止帯の差の施設間差はやや大きくなった。SOP 改訂の一つの結果と考えられる。

添付資料

- 資料 1 主実験研究計画書
- 資料 2 主実験研究報告書
- 資料 3 補完実験研究計画書
- 資料 4 補完実験研究報告書
- 資料 5 主実験 SOP
- 資料 6 補完実験 SOP
- 資料 7 酵母光生育阻害試験の最終改訂 SOP