

光毒性試験代替法バリデーション研究 補完実験報告書

2006年12月28日

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. はじめに

日本動物実験代替法学会（以下「本学会」）バリデーション委員会（以下「バリデーション委員会」）は、本学会会長より、2006年6月16日に「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」）のための酵母光生育阻害試験（以下「酵母試験」）について、改訂 SOP の妥当性検証のためのバリデーション研究を行うことを依頼された（資料(2)参照）。

これは2004年に報告された酵母光-赤血球試験のバリデーション研究（以下「前研究」）の結果に対して、本学会評価委員会（以下「評価委員会」）が SOP に不備があることを指摘してその改訂を求め、結果として2006年6月にその改訂が行われたためである。

バリデーション委員会は、依頼に応じるため、「酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会」（以下、「実行委」、資料(7)参照）を組織し、研究（以下「本研究」）を委託した。実行委員は、板垣宏、石川牧恵、石川公平、大森崇、岡本裕子、川端留美、小島肇、田中憲穂、土肥孝彰、長谷川靖、穂谷昌利、吉村功（委員長）の12人である。

実行委は、「光毒性試験代替法補完実験計画書」（以下「計画書」、資料(6)参照）に基づいて2006年7月4日の打合会を出発点として、石川牧恵、今井教安、米澤理一郎、松永康明、若栗忍の6人を実験担当者として、組織的な研究を開始した。

実行委は、計画書にそって、強度計の校正、被験物質の選択、試料・機材の配布を行い、実験担当者は改訂 SOP に従って、予備実験と本実験を9月末までに行った。データ解析担当者は、実験担当者から送られたデータを吟味・確認した上で解析を行い、データ解析報告書 ver1.1 を作成した。実行委は、2006年10月30日に中間報告会を開催して内容を検討し、データ解析報告書と SOP の改訂について意見をまとめた。

本報告書は、中間報告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

本研究の目的は、今回の SOP 改訂が、酵母-赤血球試験における施設内変動、施設間変動を縮小するという側面、in vivo の結果の予測という側面で有用であるかを、実験を通して吟味することである。

3. 研究の遂行

研究は概ね計画書にそって遂行された。

3-1) 実験の方針

酵母-赤血球試験は2つの試験を併せて光毒性を評価する試験であるから、本来なら補完実験も前研究と同様な規模で行うべきであった。しかしながら(1) 今回の改訂は酵母試験に限定されていた、(2) 前回の規模で実験を行うことは実験施設の負担が大きすぎて実行不可能であった、という2つの理由から、実行委は、本研究での実験を酵母試験のみで行うことにした。そのため、実験参加施設、被験物質共に前研究の赤血球光溶血試験（以下「赤血球試験」）のデータが存在するものに限定せざるを得なかった。すなわち、赤血球試験に関しては前研究のデータを用いることとなった。

3-2) 実験施設

実験を行った施設は、前研究に参加した 6 施設のうち、前実験の施設代表委員が当該施設を退職した 1 施設を除く、以下の 5 施設である。（括弧内は実験担当者）

(株)コーセー研究本部品質保証センター（今井教安）
 (株)資生堂安全性・分析センター（石川牧恵）
 (財)食品薬品安全センター秦野研究所（若栗忍）
 日本メナード化粧品（株）総合研究所（松永康明）
 マルホ（株）京都 R&D センター（米澤理一郎）

3-3) 被験物質とその割り当て

実験の方針上の制約から、被験物質とその割り当ては前研究と同じものであり、その内容は表 1 の通りである。試料送付におけるコードは、予測可能性を小さくするように前研究と異なるものとした。

表 1 各施設で実験を行った物質（○印）

被験物質名	コード	in vivo 判定	施設コード				
			a	c	D	e	f
アントラセン	A	P	○	○	○	×	×
アミオダロン	B	P	○	○	○	×	×
クロルヘキシジン	C	N	○	○	○	×	×
クロルプロマジン	D	P	○	×	×	○	○
ピチオノール	E	N	○	×	×	○	○
SLS	F	N	○	×	×	○	○
アクリジン	G	P	×	○	○	○	○
6-メチルクマリン	H	N	×	○	○	○	○
Parsol 1789	I	N	×	○	○	○	○

3-4) 光源と強度計の校正

太陽光のシミュレーション光源はすべての施設で Dr. Hönle 社の SOL500 にした。光の強度計の校正を 2006 年 7 月 10 日に行ったところ、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。その換算係数はデータとして報告されている。

3-5) 吸光度の測定波長と実験条件の記録

前研究と全く同じとした。（資料(9)参照）

4. 結果の要約

実験で得られたデータは、計画書に従ってデータ解析担当者に送られ、解析された。

その詳細は「データ解析報告書 ver1.2」（資料(5)参照）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、細部を確かめたいときはこれを参照していただきたい。

4-1) 施設内再現性

本研究では、施設内データ量が少なので施設内再現性を評価するのが困難である。その難点を緩和するために、酵母-赤血球試験としては平均値を用いるべき繰り返しの測定値を、個別の測

定値として扱って施設内再現性の評価に利用した。また、酵母-赤血球試験では使わないことになっている測定値も施設内再現性の評価に用いた。そのデータは表2の通りである。

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、この報告では、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3の場合に施設内で判定の違いが生じていた。この結果は前研究より施設内再現性の良いものであるから、SOPの改訂によって施設内再現性は改善されたと考えられる。

改訂SOPでの酵母試験の用量反応曲線は、ほとんどの施設で1回目と2回目と同じ傾向であったが、そうでない施設も散見された。SOP改訂によっても施設内ばらつきは多少残っていると考えられる。

表2 施設内再現性評価に利用したデータ

		被験物質 コード	試験法	実験 回数	施設内 再現性	施設間 再現性	理由
施設 コード	e	D	酵母	1	○	×	・用量の設定を間違えて、後に追加の2試験が提出されているため施設間再現性の評価から除外。
		D	酵母	2	○	×	
	f	F	酵母	2	○	×	・予備試験および本試験1回目の結果とあわず光毒性陽性となったが、原因は不明。やり直しのため、3回目を実施。よって2回目の結果は施設間再現性の評価からは除外。
	a	D	赤血球	1	○	×	・用量の設定を間違えて、後に追加の2試験が提出されているため施設間再現性の評価から除外。
		D	赤血球	2	○	×	
	c	H	赤血球	4	○	×	・計画書には4回目を実施するようには記載されていない。
	e	D	赤血球	1	○	×	・1回目はその施設で購入した陽性対照物質を用いて実験が実施されており、後に2試験を実施しているため施設間再現性の評価からは除外。(実質的には指標の計算に陽性対照は使われていない)
		E	赤血球	1	○	×	
		F	赤血球	1	○	×	
		G	赤血球	1	○	×	
H		赤血球	1	○	×		
	I	赤血球	1	○	×		

表3 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 +

4-2) 施設間再現性および *in vivo* 判定との類似性

表4は施設間再現性の検討結果を要約したものである。採用している指標は次の通りである。

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：*In vivo* 判定と判定が一致した割合

注：感度Iと感度IIの値が同じだったので、特異度については両者を区別しなかった。

表4 施設間再現性 (P:陽性, E:擬陽性, N:陰性)

被験物質	コード	In vivo 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	G
アクリジン	G	P		P	P	P	P
6-メチルクマリン	H	N		G	N	P	P
Parsol 1789	I	N		N	N	N	N

表5 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%)

すべての施設 (3 または 4 施設) で判定が陽性となった陰性物質は 1 物質 (物質 C, クロルヘキシジン) のみで, 前研究の 2 物質と比較して減少した。物質 C は, 本研究で実施された酵母光生育阻害試験でも用量反応関係がほぼ見られなかったため, 陽性判定は赤血球光溶血試験のためである。

5. 考察

5-1) SOP 改訂の陽性対照に関する影響

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) 被験物資による SOP 改訂の影響の違い

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。

5-3) 阻止円の測り方

中間報告会の討論において, 実験担当者から阻止円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(8)4.18 参照)

5-4) 酵母試験での施設間差

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。

6. まとめ

最後に、補完実験の研究で得られた結果をまとめておく。

6-1) 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改訂の妥当性であったと考えられる。

6-2) バッテリーシステムでの判定は、感度Ⅰ、感度Ⅱともに100%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。それにもかかわらず特異度も改善されたから、SOP改訂は有用であったと考えられる。

6-3) 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。

6-4) すべての施設(3または4施設)で、バッテリーシステムでの判定とIn vivoの結果が一致したのは9物質中4物質で、前研究の2物質より多かった。これもSOP改訂の結果である。

6-5) すべての施設(3または4施設)で判定が陽性となった陰性物質は1物質(物質C, クロルヘキシジン)のみで、前研究の2物質と比較して減少した。これもSOP改訂の結果である。

