

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる
光毒性試験代替法の第三者評価報告書

平成 21 年 5 月 13 日
改定平成 22 年 5 月 17 日

光毒性試験代替法の第三者評価委員会

評価委員長	笛木 修	(医薬品医療機器総合機構)
評価委員	戸倉 新樹	(産業医科大学 皮膚科学)
評価委員	小野寺 博志	(医薬品医療機器総合機構)
評価委員	今井 弘一	(大阪歯科大学 歯科理工学講座)
評価委員	細井 一弘	(参天製薬株式会社 研究開発センター)
評価委員	山田 弘	(独立行政法人医薬基盤研究所基盤的研究部)
オブザーバー	小島 肇	(国立医薬品食品衛生研究所 薬理部)

要旨および結論

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる光毒性試験代替法の有用性を評価した。本評価法の提案者である(株)資生堂品質評価センター(以下、資生堂)による検討試験では、香料、紫外線吸収剤、医薬品、抗菌剤、染料といった分類から、既に *in vivo* で光毒性が評価済みの 24 物質の評価が行われており、十分な感度と *in vivo* 判定との一致率が得られている。この結果の普遍性を示すために、日本動物実験代替法学会により多施設バリデーション試験が実施された。一次バリデーション試験では 9 物質が用いられ、試験実施施設 (6 施設) に 6 品目ずつ名称を隠し、コード化して供与された。試験に際しては実施に先立って技術講習会が行われ、GLP の原則に則ってプロトコールに従って実施された。施設内再現性を見たところ、1 施設 (施設 b) で、特に再現性が悪く、この理由として他施設を借用して試験を実施したため、実験環境の制御に困難性があったことが挙げられている。施設間再現性についても 4 物質 (Acridine、BMDM: 4-t-butyl-4-methoxydibenzoylmethane、CHD: Chlorhexidine および Bithionol) を除き、施設間で結果が一致せず、再現性は良好とはいえない結果であった。また、CHD および Bithionol は *in vivo* で陰性物質と判断されているものの、本試験結果では陽性との判断がなされており、逆に *in vivo* で陽性とされた物質で疑陽性あるいは陰性と判断される場合が存在した。一次バリデーション試験の結果において、施設 b の結果を除外し、疑陽性判定を陽性判定と見なした場合には *in vivo* 判定との一致率は 70%であった。

一次バリデーション試験の結果では、陽性物質の結果が疑陽性と判定され、結果がばらついたことから、この点を改善するために酵母光生育阻害試験の陽性結果の判定基準の変更やプレインキュベーション時間の設定等のプロトコール整備が行われ、補完試験が実施された。補完試験は一次バリデーション試験と同じ物質を用い、施設 b を除いた 5 施設で実施された。補完試験では疑陽性判定が少なくなり、施設内再現性および施設間再現性共に一次バリデーション試験に比して良好な結果が得られており、プロトコール改善の効果が認められているものと判断された。

プロトコール改善後の本試験法では、陰性物質を誤って陽性と判断する可能性はあるものの、陽性物質を誤って陰性と判断した事例はなく、安全性上の観点から *in vitro* 光毒性スクリーニングの手法として、利用可能であると考えられる。本試験法のメリットとしては、①水難溶性物質の評価が可能と考えられている。②必ずしも無菌操作が必要でなく、操作が簡便である。③比較的低コストである。等がある一方、デメリットとして、①組み合わせ (バッテリー) 試験法のため、単一試験である 3T3-NRU 法に比べ試験に時間を要する。②疑陽性と判定される物質が存在する。等の問題点も存在する。また、以下に挙げるような問題点については現状で未解決であり、今後の課題と考えられる。①本試験法のメリットの一つと考えられている水難溶性物質の評価が十分に行われていない。少なくとも 4 水難溶性物質を用いたバリデーションの実施を要望する。②最終的に整備されたプロトコールにおける検討物質数は 9 物質のみであり、本法が広範囲の被験物質に適用可能かどうか不明である。資生堂が過去の検討試験で用いた 24 物質程度 (バリデーションが終了している物質を除く) を用いた追加検討を要望する。③3T3-NRU 法との直接比較がなされておらず、改定プロトコールでのデータを用いた結果において同等性あるいは優越性が明確に示されていない。④異なる光源を使用した際の結果の安定性についてバリデーションでは評価されていない。⑤温度上昇による結果の差異が言及されているが、この点に関する追加検討が実施されていない。⑥3T3-NRU 法と同様に、代謝活性化系が設定されていないため、経皮投与以外の全身曝露の際の安全性が評価できない。⑦バッテリーの 2 試験の実施順序を規定する必要性に関する検討がなされていない。⑧酵母光生育阻害試験における陽性判定のカットオフ値について再検討の余地がある。⑨赤血球光溶血試験の吸光度測定波長の選定

に再検討の余地がある。

以上のように、本試験法には光毒性物質のスクリーニング法として一定の有用性は認められるものの、十分な信頼性を持って実用化するためにはまだ検討すべき問題点が残っていると考えられる。

評価結果

1. 試験法の科学的および規制面からの妥当性

In vitro 光毒性試験法としては、既に 3T3 細胞を用いてニュートラルレッドの取り込みを指標とした光毒性試験法（3T3-NRU 法）が OECD の専門家会議で承認されているが、3T3-NRU 法では水難溶性の薬物において評価結果のばらつきが大きくなる可能性が示唆されている（平成 14 年度厚生労働科学研究報告書）。今回提案された評価手法は、3T3-NRU 法と同等の結果が期待でき、また、水難溶性物質に対しても比較的容易に対応が可能である。また、いずれの試験法も簡便であり、必ずしもクリーンベンチでの操作を必要としない点もメリットの一つと考えられる。

酵母光生育阻害試験は、細胞膜と細胞小器官への作用に対する毒性を通じた細胞死や増殖抑制を指標とする方法であり、赤血球光溶血試験は細胞膜破壊を指標とする方法である。提案された組み合わせ（バッテリー）試験法は両者を用いることにより、多様な作用機序に基づく光毒性を評価できると共に、光毒性のメカニズムに関する情報を得ることが出来ると考えられる。

光毒性につながる光化学反応には、光により励起された化学物質の緩和過程により、いくつかの反応がある。それらは電子伝達に基づく機構（タイプ I）、酸素のエネルギー伝達に基づく機構（タイプ II）およびそれ以外の機構に大別される。これらの機構は水の有無や媒体の種類などの試験系により大きく変化する。例えば、水系ではタイプ II の反応が中心と考えられ、有機溶媒ではタイプ I のラジカル反応が中心と考えられている。反応系が水系の赤血球光溶血試験や培養細胞を用いた光毒性試験では主にタイプ II の光毒性を捉えていると考えられるが、酵母光生育阻害試験では種々の媒体が使用可能であり、より広範囲の化合物の光毒性を捉えることができるものと期待される。

単細胞生物である酵母では、基本的に細胞に対する全ての影響を観察できるものと想定されるが、赤血球を用いた系で光毒性を検出できた物質の一部は、酵母を用いた系では捉えられない可能性がある。これは赤血球の膜構造が細胞膜のみから構成されるのに対し、酵母では細胞膜に加え、グルカン等の多糖類から構成される細胞壁が存在するためであり、酵母の膜構造が赤血球より安定であることに起因すると考えられる。すなわち、酵母を用いた系では膜破壊作用の弱い物質の光毒性は捉えにくいものと考えられる。また、細胞壁の存在により、被験物質あるいは光活性化体が細胞内標的部位に到達せず、疑陰性の結果を導く可能性がある。これらのことから、細胞膜に障害を与える光毒性物質の評価においては、赤血球光溶血性試験の感度が高いと考えられる。

一方、酵母は有機溶媒に強く、エタノール、メタノール、アセトンおよび DMSO (Dimethyl sulfoxide) を直接濾紙上に滴下しても阻止円の広がりは全く認められていない。この点、赤血球溶血性試験では 1% の DMSO 添加でも溶血が生じる場合がある。

すなわち、酵母は細胞膜に障害を与えるタイプの光毒性に関する検出感度は若干低い、耐溶媒性が高いこと、細胞の生存・生育に関わる全ての過程への影響を検討できることから、広範囲の被験物質や多くの作用機序による光毒性の検出に適用できると考えられた。これに対し、赤血球光溶血試験の方は細胞膜に障害を与えるタイプの光毒性に関する検出感度が高く、作用機序が明確であることと、弱い作用を感度良く検出できる利点があると考えられた。したがって、これら二つの方法を組み合わせることにより、想定される状況を幅広くカバーできるものと考えた。

2. 試験プロトコール構成の妥当性

「酵母光生育阻害試験」および「赤血球光溶血試験」の光毒性検出メカニズムとして、化学物質が太陽光により励起され、基底状態に戻るときに放出されるエネルギーにより生じる活性酸素やフリーラジカル、あるいは光励起された化学物質自体が生体へ及ぼす作用を、細胞膜破壊や細胞内小器官に対する影響として検出する。バッテリー試験法は初めに「酵母光生育阻害試験」を評価し、陰性の場合に「赤血球光溶血試験」を実施し、両試験が陰性の場合に光毒性なしと判定する。なお、バリデーション報告書（2008年1月）では、本バッテリー試験法では両者の組み合わせで評価するところに大きな意味を有することから、施設での作業のしやすさの関係から「赤血球光溶血試験」を先に実施しても差し支えないことをプロトコールに明記すべきと指摘されており、試験の順序を規定することの可否については検討が必要と考えられた。

「酵母光生育阻害試験」はまず、4%ポテトデキストロース寒天培地に酵母菌を含有させた6ウェルマイクロプレートを作製する。被験物質は最高溶解濃度もしくは投与可能な最高濃度を含む5倍希釈で4系列準備する。溶媒としては精製水、エタノール、アセトン、メタノールおよびDMSOを用いることができ、最も高い溶解度を与える溶媒を選択する。滅菌したアルミ箔上に必要枚数の濾紙円板を並べ、溶解被験物質、溶媒、陽性対照を濾紙上に滴下する。用意した6ウェルマイクロプレートに滴下濾紙を密着させる。

照射光源としては資生堂における開発時はUVA（紫外線A波）を照射するトランスイルミネータ（Vilber Lourmat社製）が用いられたが、バリデーション研究時にはUVB（紫外線B波）から可視光領域までをカバーするMetal halide lamp（Dr. Honle GmbH社製）、パワーサプライ（Dr. Honle GmbH社製）を装備したSOL500（Dr. Honle GmbH社製）が用いられた。フィルターはUVBをカットするH1を使用し、紫外線強度計（Dr. Honle GmbH社製もしくは（株）トプコン製）でUVAの強度を測定し、（株）トプコン製紫外線強度計を用いる場合には紫外線強度をDr. Honle GmbH社製に補正した上で照射している。

照射終了後、照射、非照射マイクロプレートを反転させ、25℃で72時間培養している。阻止帯の直径の測定はノギスを用いて直交する方向で平均を求め、濾紙円板の直径を差し引いて照射プレートと非照射プレートの差で評価する。阻止帯の明瞭度合いも参考として記録する。

阻止帯の差（Z; mm）＝照射プレートの阻止帯－非照射プレートの阻止帯
各プロトコールの概要は以下のとおりである。

「酵母光生育阻害試験」について一次バリデーション試験結果より陽性対照である8-MOP（8-メトキシソラーレン）を含めいくつかの陽性被験物質（阻止帯の差が5mm以上となるべき物質）の阻止帯がグレーゾーン（2mm≦阻止帯の差<5mm）に分類されたことから、陽性対照物質が陽性となる新たな試験条件の設定が必要となり、以下の条件が補完試験に向けて設定された。

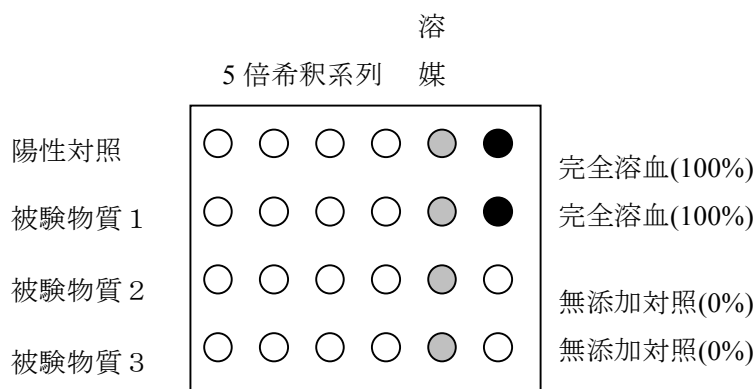
	一次バリデーション試験		補完試験
線量	8.5J/cm ²	→	20J/cm ²
8-MOP濃度	0.01% (0.1 mg/mL)	→	0.1% (1 mg/mL)
ブレインキューベーション	なし	→	5時間

以上の条件変更により、陽性物質の疑陰性は認められなくなり、Bithionol、6-MC (6-methylcoumarin)、SLS (Sodium lauryl sulfate) の3品だけが疑陽性結果となった。なお、バリデーション報告書中に、

「酵母光生育阻害試験」のカットオフ値（5mm）について、3～4mm に変更することで施設間再現性が良くなることから再検討すべきと指摘されており、カットオフ値見直しの要否について、検討が必要と考えられた。

「赤血球光溶血試験」は上清液の吸光を、マイクロプレートリーダーを用いて測定し、赤血球膜破壊による溶血度を算出する手法で、プレート中に浮遊している赤血球と反応させるため、膜破壊や蛋白変性を生じない溶媒を選択する必要がある。

被験物質溶液は精製水、アルコール、アセトンおよび DMSO が用いられ、陽性対照としてアクリジン 10%(w/v)アセトン溶液を 5 倍希釈で 4 系列調整している。使用した赤血球はヒトからヒツジに変更されている。赤血球混濁液にジエチルエーテル添加後攪拌、超音波処理を施した完全溶血(100%コントロール)を作成し無添加対照(0%)との基準に用いている。



同じプレートを 4 枚作成し、2 枚は照射用で残りは非照射用とし 2 度繰り返す。

光源は資生堂における開発時はトランスイルミネータ（Vilber Lourmat 社製）が用いられたが、バリデーション研究時からはソーラーシミュレーター、SOL500（Dr.Honle 社製）を用い、短波長紫外線部領域(UVB)をカットする H1 フィルターを用い、光源が安定した時点で紫外線強度計(UVA-Meter, Dr.Honle 社製)で測定し、6.2 J/cm²を照射している。「赤血球光溶血試験」では照射後のプレートを攪拌、遠心分離し上清をマイクロプレートリーダーに移して、540nm 領域での吸光度を測定した。光溶血度の算出は非照射（2 プレート）の平均を求めた上で照射（2 プレート）の平均を基に計算する。なお、バリデーション研究報告書(2004 年 8 月)において、吸光度の測定波長は 540nm より 525nm 前後の波長を用いる方が良かったのでプロトコールでも波長を変更することを検討すべきと指摘されており、吸光度の測定波長については検討が必要と考えられた。

溶血度の差 (L;%) = 照射プレート[100 X (OD 被験物添加 - OD 溶媒添加) / (OD 完全溶血平均 - OD 無添加対照平均)] - 非照射プレート[100 X (OD 被験物添加 - OD 溶媒添加) / (OD 完全溶血平均 - OD 無添加対照平均)]

L < 5 で光毒性は陰性、5 ≤ L < 10 で疑陽性、10 ≤ L で陽性と評価される。

3. バリデーションに用いられた物質の分類

資生堂における検討試験における光毒性評価の対象物質としては、以下のものが用いられている。

1) 香料

Musk ambrette、Musk ketone、Musk xylene、Phantolid、Galaxolide、8-methoxypsoralen (8-MOP)、

5-methoxypsoralen (5-MOP)、6-methylcoumarin (6-MC)

2) 紫外線吸収剤

Parsol 1789、Parsol MCX、ASL-24、ASL-24S、Escalol 507(D)

3) 医薬品

Sulfanilamide、Indomethacin、Piroxicam、Chlorpromazine (CPZ)

4) 抗菌剤

TCC、Bithionol、TBS、TCSA

5) 染料

Rose bengal、Acridine、Anthracene

これらは、いずれも光毒性物質、あるいは光アレルギー物質、または両方の性質をもつものとして知られている。ただし光アレルギー性物質は多かれ少なかれ光毒性を有するため、全ての物質を光毒性評価の対象物質とみなしうる。これらの中で、臨床的あるいは古典的実験系で特に重要とされるのは以下である。

TCSA は強い光毒性と光アレルギー性を有する物質であり、過去に欧州で多くの光アレルギー性接触皮膚炎の患者が発生した。

8-MOP は DNA に光結合する強い光毒性を有するが、光アレルギー性はほとんど生じない。そのために光化学療法に利用されている。5-MOP も同様に強い光毒性を持つ。

Musk ambrette, Bithionol, 6-MC は光アレルギー性接触皮膚炎を起こすことが知られている。上記物質より光毒性は弱いと思われる。

医薬品の中では sulfanilamide が UVB を作用波長に持つ物質として知られている。Piroxicam は光アレルギー性光線過敏症を起こす。Chlorpromazine や Indomethacin の光線過敏症の頻度はそれより低い。

バリデーション試験においては、EU/COLIPA あるいは資生堂における *in vivo* での評価結果を基に以下の 9 物質が選択されている。

1) 香料

Anthracene

2) 紫外線吸収剤

4-t-butyl-4-methoxydibenzoylmethane (BMDM)

3) 医薬品

Amiodaron、Chlorpromazine (CPZ)

4) 抗菌剤

Bithionol、Chlorhexidine (CHD)

5) 染料

Acridine、6-methylcoumarin (6-MC)

6) その他

Sodium lauryl sulfate (SLS)

BMDM は Parsol 1789 と同じ物質であるが、名前を区別化して用いられているため、資生堂の検討試験での Parsol 1789 とは入手先が異なるか、あるいは純度が異なると思われる。

CHD、SLS は陰性コントロールとして検討されたものとする。

4. 試験法の正確性を評価する物質の *in vivo* および参照データ

資生堂における検討試験で用いられた物質について、臨床的頻度を加味し、モルモットの *in vivo* のデータをもとにすると各物質の光毒性の強さは以下のように考えられる。

1) 強い光毒性をもつグループ

TCSA,8-MOP, 5-MOP, Phantolid, Galaxolide, Acridine, Anthracene

2) 中等度の光毒性をもつグループ

Musk ambrette, Musk ketone, Musk xylene, 6-methylcoumarin, Sulfanilamide, Piroxicam, Chlorpromazine, TCC, Bithionol, TBS

3) 弱い光毒性をもつグループ

Parsol 1789, Parsol MCX, ASL-24, ASL-24S, Escalol 507(D), Indomethacin, Rose bengal

本バッテリー評価で光毒性(+)とされた物質は、TCSA、8-MOP、5-MOP、Phantolid、Galaxolide、Acridine、Anthracene、Chlorpromazine であり、Chlorpromazine を除いて全て上記 1)のグループに含まれている。また本評価で光毒性(-)とされた物質は、TCC、Sulfanilamide、Indomethacin、Piroxicam、Parsol 1789、Parsol MCX、ASL-24、ASL-24S、Escalol 507(D)、Musk ambrette、Musk ketone、Musk xylene であった。

従って、光毒性のバッテリー評価では、Chlorpromazine をやや過大評価し、Sulfanilamide、Piroxicam、Musk をやや過少評価している可能性があるものの、臨床的実態あるいは *in vivo* 試験の結果とほぼ一致していると考えられる。

バリデーション試験において用いられた物質について、臨床的頻度を加味し、モルモットの *in vivo* のデータをもとにすると各物質の光毒性の強さは以下のように考えられる。

1) 強い光毒性をもつグループ

Acridine、Amidaron、Anthracene

2) 中等度の光毒性をもつグループ

Bithionol、CPZ、6-MC

3) 弱い光毒性をもつグループ

BMDM

4) 光毒性がないまたは極微のグループ

CHD、SLS

本バッテリー評価では、施設 b は他施設と結果が異なり、また被験物質の光毒性を反映した結果ではないために、評価から除外したい。その上で、光毒性(+)と評価された物質は、Acridine、Amidaron、Anthracene、CPZ であった。また光毒性(-)と判定された物質は、Bithionol、6-MC、BMDM、CHD、SLS であった。よって 1)のグループに属する物質はすべて陽性、2)のグループに属する物質の 1 つが陽性で 2 つが陰性、3)および 4)に属する物質はすべて陰性であった。光感受性物質（臨床的には光アレルギー）として知られる Bithionol と 6-MC の光毒性が過小評価されたともいえるが、これらの物質による光線過敏症が光アレルギー性機序で起こっていることを考慮すると、各物質の光毒性を概ね正當に評価していると考えられる。

5. すべてのデータおよび結果

1990年に資生堂の社内で光毒性試験代替法の検討が開始され、赤血球光溶血試験法ならびに酵母光生育阻害試験法の導入、バッテリー試験法の導入を検討され、1997年に代替法による評価フロー提案がなされた。2003年2月15日に光毒性評価方法の提案がなされ、2004年1月から4月にかけて、(株)コーセー研究本部品質保証センター(以下、コーセー)、(財)食品薬品安全センター秦野研究所(以下、食薬センター秦野研)、東洋ビューティ(株)中央研究所(以下、東洋ビューティ)、日本メナード化粧品(株)総合研究所(以下、日本メナード化粧品)、マルホ(株)京都R&Dセンター(以下、マルホ)、資生堂の計6機関でバリデーションが実施された。同年8月にはバリデーション研究報告書が提出された(第一次バリデーション結果)。しかし、酵母光生育阻害試験において陽性対照が明確に捉えられるように条件の変更が必要であるとの結論から、2006年7月～9月末まで、前記6機関のうち、東洋ビューティを除く5機関で、酵母光生育阻害試験のバリデーション補完実験が実施された(補完試験結果)。これらの経緯から提出された複数の実験データの結果を以下の3つに大きく分類した。

5.1 資生堂における検討試験結果

5.2 第一次バリデーション結果

5.3 補完試験結果

2006年末に補完研究報告書が提出され、2008年1月に光毒性試験代替法バリデーション研究報告書が提出された。なお、各機関で実施されたすべての試験結果について、詳細な情報が提出されており、これらを用いて評価した。

5.1 資生堂における検討試験結果

資生堂における検討試験結果については、別添する。

5.2 第一次バリデーション結果

5.2.1 被験物質

EU/COLIPAでの*in vivo*評価結果、ならびに資生堂の*in vivo*評価結果をもとに下記の陽性(P)ならびに陰性(N)、または光毒性が考えられない化学構造の物質(E)を選択された。なお、各施設には、それぞれ物質名を隠してコード化し、異なった組み合わせの陽性物質3種と陰性物質3種の計6種をそれぞれ供された。

表 1.

物質名(略名) P(陽性):4 N(陰性):5 の9を選択	In vivo 判定(資生堂の結果を優先)		
	本バリデーション 採用の評価	資生堂の評価 (評価点)	EU/COLIPA での評価
Amiodaron	P		P
Anthracene	P	P(1.8)	P
Bithionol	N	N(0)	P
Chlorhexidine (CHD)	N		N
Chlorpromazine (CPZ)	P	P(1.6)	P
5-Methoxypsoralen (5-MOP)	P	P(2.7)	P
Sodium lauryl sulfate (SLS)	N		N
2-Ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate (EDA)	E	E(1.0)	
4-t-Butyl-4-methoxydibenzoylmethane (BMDM)	N	N(0)	
Musk ambrette	N	N(0.7)	N
Piroxicam	N	N(0)	N
Rose bengal	N	N(0)	E
3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide (TCSA)	P	P(1.5)	P?
8-Methoxypsoralen (8-MOP)	P	P(4.8)	P
6-Methylcoumarin (6-MC)	N	N(0)	P
Acridine	P	P(2.1)	P

5.2.2 酵母光生育阻害試験の結果

総じてバラツキが多く実際の使用には耐えない結果であった。a 施設では *in vivo* で陰性の Bithionol を陽性、同じく *in vivo* 陰性の CHD を疑陽性と判定した。b 施設では誤った判定結果が目立ち、*in vivo* 陽性の Amiodaron、CPZ が陰性あるいは疑陽性と判定された。また、*in vivo* 陽性の Anthracene でも 1 回目は疑陽性と判定された。c 施設、d 施設でも誤判定が目立ち、*in vivo* 陽性の Anthracene で陰性、d 施設では *in vivo* 陽性の Amiodaron、Acridine が陰性と判定された。e 施設、f 施設も誤判定が目立ち、e 施設では *in vivo* 陽性の CPZ、Acridine が疑陽性あるいは陰性と判定され、f 施設では CPZ、Acridine が陰性と判定されるなど多くの間違いが目立った。さらに、各施設 2 回の実験間で結果に差が見られなかったのは a、f 施設のみであり、b、c、e 施設では 2 回の実験データを比べるとバラついた結果が目立った。

表 2. 酵母光生育阻害試験の結果

施設	回数(2回のデータを要求)	a			b			c			d			e			f		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Anthracene	P	P	P		E	P		E	E		E	E							
Amiodaron	P	P	P		N	N		P	E		E	E							
CHD	N	E	E		N	N		N	N		N	N							
CPZ	P	P	P		E	N								E	E	E	N	N	
Bithionol	N	P	P		E	N								E	E	E	E	E	
SLS	N	N	N		N	N								N	N	N	N	N	
Acridine	P							P	E		E	E		P	E		E	E	
6-MC	N							N	N		E	E		E	E		E	E	
BMDM	N							N	N		N	N		N	N		N	N	

<2mm: Negative, 2mm<diameter<5mm: Equivocal, >5mm: Positive

5.2.3 赤血球光溶血試験の結果

吸光度計の波長を 525nm で測定した結果、酵母光生育阻害試験の場合と同様に陽性物質が明確に特定されず、さらに 2 回あるいは 3 回の試験で異なる結果が、a、b、c 施設で認められた。2 回の試験ですべての結果が一致したのは d、e、f 施設であった。*In vivo* で陽性の Amiodaron は b 施設で疑陽性だった以外は a、c、d いずれの施設でも陰性判定とされている。また、*in vivo* で陰性の CHD、Bithionol は実施したいずれの施設でも陽性と誤判定されている。更に、b 施設では SLS を、c 施設では 6-MC をいずれも陽性と誤判定している。

表 3. 赤血球光溶血試験の結果、(波長 525nm で測定)

施設	回数(2回のデータを要求)	a			b			c			d			e			f		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Anthracene	P	E	P		P	P		E	E		P	P							
Amiodaron	P	N	N		N	E		N	N		N	N							
CHD	N	P	P		P	P		P	P		P	P							
CPZ	P	P	P	P	P	P								P	P	P	P	P	
Bithionol	N	P	P		P	P								P	P	P	P	P	
SLS	N	N	N		N	P								N	N	N	N	N	
Acridine	P							P	P		P	P		P	P	P	P	P	
6-MC	N							P	N	N	N	N		N	N	N	N	N	
BMDM	N							N	N		N	N		N	N	N	N	N	

<5%: Negative, 5%<hemolysis<10%: Equivocal, >10%: Positive

吸光度計の波長を 540nm で測定した結果、陽性物質が明確に特定されなかった。波長 525nm の結果と類似結果で、さらに Anthracene が a、b 施設で疑陽性判定となり、e 施設で CPZ が 2 回陰性と判定されている。

表 4. 赤血球光溶血試験の結果、(波長 540nm で測定)

施設	a			b			c			d			e			f		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Anthracene	P	E	E		E	E		E	N		P	P						
Amiodaron	P	N	N		N	E		N	N		N	N						
CHD	N	P	P		E	P		P	P		P	P						
CPZ	P	P	P	P	N	P								N	N	E	P	P
Bithionol	N	P	P		P	P								P	P	P	P	P
SLS	N	N	N		N	P								N	N	N	N	N
Acridine	P							P	P		P	P		P	P	P	P	P
6-MC	N							P	N	N	N	N		N	N	N	N	N
BMDM	N							N	N		N	N		N	N	N	N	N

<5%: Negative, 5%<hemolysis<10%: Equivocal, >10%: Positive

酵母光生育阻害試験結果ならびに赤血球光溶血試験結果における一次バリデーションの判定基準は以下の通りである。すなわち、酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験結果の両者あるいは一方が陽性の場合には、陽性物質と判定される。また、両者が疑陽性あるいは一方が疑陽性で他方が陰性の場合には疑陽性物質と判定され、両者が陰性の場合のみ陰性物質と判定される判定基準が採用されている。

表 5. 一次バリデーションの判定基準

		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

5.2.4 施設内再現性

b ならびに c 施設における、施設内の実験の繰り返しで結果が異なった施設ならびに被験物質の組合せを示す。とくに b 施設では多くの被験物質の結果が異なった。この理由としては b 施設では、自社に十分な実験機器がなかったため、他施設を借用して試験を実施した結果、実験環境の制御に困難性があったことが挙げられている。

表 6. 施設内再現性

施設	被験物質	In vivo	可能性
b	A (Anthracene)	P	EまたはP
	B (Amiodaron)	P	NまたはE
	C (CHD)	N	EまたはP
	D (CPZ)	P	NまたはEまたはP
	F (SLS)	N	NまたはP
c	B (Amiodaron)	P	NまたはE (cut-off値ぎりぎり)
	H (6-MC) *	N	NまたはP

(* 光溶血試験で1回目と2回目が大きく異なっているが、追加試験で補正されているため評価には影響を与えない。(1回目と2回目が大きく異なる場合は3回目を実施して提出する。2回のデータを得ることがプロトコールに記載)

5.2.5 施設間再現性

施設間再現性は必ずしも良いとは言えなかった。すなわち、Acridine、BMDM、CHD および Bithionol 以外では施設間で結果が一致せず、半数以上の物質で再現性が不良であった。なお、CHD と Bithionol では *in vivo* における判定では陰性であるが、本法ではすべての施設で陽性と判定された逆の結果が得られている。ただ、陽性物質が各施設共通で陰性と判断されることはなかった。

表 7. 施設間再現性、その 1

物質名(略名)	コード	In vivo 判定	施設コード					
			a	b	c	d	e	f
Anthracene	A	P	P	E	E	P		
Amiodaron	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

感度、特異度ならびに一致度を表に示す。疑陽性判定を陽性判定と見なした場合に *in vivo* 判定との一致率は、b 施設を除外した 5 施設では 70%、すべての施設では 64%であった。疑陽性を陽性とするれば、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。

表 8. 施設間再現性、その 2

	施設コード (bを除く)					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%)

	施設コード (bを含む)						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 (0%)	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 (87%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	23/36 (64%)

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 9. 施設間再現性、その 3

物質	施設	酵母	赤血球	総合	物質	施設	酵母	赤血球	総合
A Anthracene (P)	a	P	(E)	P	F SLS (N)	a	N	N	N
	b	E	E	E		b	N	P	P
	c	E	N	E		e	N	N	N
	d	E	P	P		f	N	N	N
B Amiodaron (P)	a	P	(N)	P	G Acridine (P)	c	P	(P)	P
	b	N	N	N		d	E	P	P
	c	P	(N)	P		e	E	P	P
	d	E	(N)	E		f	E	P	P
C CHD (N)	a	E	P	P	H 6-MC (N)	c	N	N	N
	b	N	P	P		d	E	N	E
	c	N	P	P		e	E	N	E
	d	N	P	P		f	E	N	E
D CPZ (P)	a	P	(P)	P	I BMDM (N)	c	N	N	N
	b	N	E	E		d	N	N	N
	e	E	N	E		e	N	N	N
	f	N	P	P		f	N	N	N
E Bitlisonol (N)	a	P	(P)	P	36試験中14試験でBatteryでの評価が酵母試験単独から変化しており、両者の組合せが大きな意味を持っている。				
	b	E	P	P					
	e	E	P	P					
	f	E	P	P					

施設間再現性の結果から、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疑陽性、疑陽性と陰性の範囲に収まっていた。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。酵母光生育阻害試験、または赤血球光溶血試験単独結果とそれらを組合せた結果と異なる施設が多く、バッテリー試験の有用性が認識できた。しかし、in vivo と比べて第一次バリデーション試験の評価条件では

必ずしも良好な結果とを示したとは言えず、改善の必要があった。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べきと思われる。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ことが示された。

5.2.6 吸光度測定における波長の影響

赤血球光溶血試験における吸光光度計の波長を 540nm の場合と 525nm の場合とを比較した。525 nm での判定の方が感度、一致度の両面で良い結果が得られた。

表 10. 吸光度測定における波長の影響

	施設コード (540 nmで評価)						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	94.9
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致度 I	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 (525 nmで評価)						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	94.9
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致度 I	67	33	67	50	67	67	58.3
一致度 II	67	33	83	67	83	67	77.8

感度 II：陽性物質を陽性または疑陽性と判定した割合

一致度 II：疑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

5.3 補完試験結果

第一次バリデーション結果にもとづいて、陽性物質として採用した物質が、いくつかの施設でグレーゾーンに落ちており、結果がばらついていることを改善するために、陽性対照である 8-MOP の適用濃度の変更や、Rose bengal を用いたプレインキュベーション時間の検討、光源の種類や光源を覆う暗幕などのプロトコル整備が提案され、酵母光生育阻害試験の補完試験が実施されている。その結果について下記に示す。

5.3.1 酵母光生育阻害試験の結果

第一次バリデーション結果と異なり、陽性物質が明確に陽性と判定された。一方、陰性物質が陽性と判定される場合が増加した。d ならびに f 施設の 1 物質のみで結果がばらついたが、全般的に良好な再現性が認められている。

表 11. 酵母光生育阻害試験の結果

	a			b			c			d			e			f		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Anthracene	P	P	P				P	P		P	P							
Amiodaron	P	P	P				P	P		P	E							
CHD	N	N	N				N	N		N	N							
CPZ	P	P	P										P	P		P	P	
Bithionol	N	P	P										N	N		P	P	
SLS	N	N	N										N	N		E	E	P
Acridine	P						P	P		P	P		P	P		P	P	
6-MC	N						E	E		N	N		P	P		P	P	
BMDM	N						N	N		N	N		N	N		N	N	

5.3.2 施設内再現性

施設内の実験反復で結果の異なった c、d、f 施設での被験物質を表に示す。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、3 被験物質については表の通り、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が良くなっており、プロトコール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。

表 12. 施設内再現性

施設	被験物質	In vivo	可能性
c	H (6-MC)	N	±または+(赤血球の問題)
d	B (Amiodaron)	P	±または+
f	F (SLS)	N	±または+

判定基準は、一次バリデーションの判定基準と同様の基準を用いた。

表 13. 補完試験の判定基準

		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

5.3.3 施設間再現性

表 14. 施設間再現性

物質	施設	酵母	赤血球	総合	物質	施設	酵母	赤血球	総合
A Anthracene (P)	a	P	(E)	P	F SLS (N)	a	N	N	N
	b					b			
	c	P	N	P		e	N	N	N
	d	P	P	P		f	E	N	E
B Amiodaron (P)	a	P	(N)	P	G Acridine (P)	c	P	(P)	P
	b					d	P	P	P
	c	P	(N)	P		e	P	P	P
	d	P	(N)	P		f	P	P	P
C CHD (N)	a	N	P	P	H 6-MC (N)	c	E	N	E
	b					d	N	N	N
	c	N	P	P		e	P	N	P
	d	N	P	P		f	P	N	P
D CPZ (P)	a	P	(P)	P	I BMDM (N)	c	N	N	N
	b					d	N	N	N
	e	P	N	P		e	N	N	N
	f	P	P	P		f	N	N	N
E Bithionol (N)	a	P	(P)	P	Battery での評価が酵母試験単独から変化したのは 30試験中4試験まで減少した。				
	b								
	e	N	P	P					
	f	P	P	P					

補完試験における施設間再現性は SLS、6-MC を除いてすべて *in vivo* 結果と一致した。なお、SLS の場合は f 施設のみ疑陽性判定となり、他が陰性判定、6-MC の場合は c 施設のみ疑陽性判定となり、他が陽性判定であった。しかし、第一次バリデーションの結果と比較すると飛躍的にほとんどの化学物質で一致していることが示された。

表 15. 施設間再現性

物質名(略名)	コード [△]	In vivo 判定	施設コード [△]				
			a	c	d	e	f
Anthracene	A	P	P	P	P		
Amiodaron	B	P	P	P	P		
CHD	C	N	P	P	P		
CPZ	D	P	P			P	P
Bithionol	E	N	P			P	P
SLS	F	N	N			N	E
Acridine	G	P		P	P	P	P
6-MC	H	N		E	N	P	P
BMDM	I	N		N	N	N	N

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 2 物質（CHD および Bithionol）であった。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ことが示された。

表 16. 施設間再現性

	施設コード (赤血球光溶血試験は 540nm の値を使用)					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%)	13/13 (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 (47%)
一致度	4/6 (67%)	4/6 (67%)	5/6 (83%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	18/30 (60%)

プロトコール改訂により、陽性物質の判定はすべての施設で陽性判定となった。この面ではプロトコール改訂の成果があったものと考えられた。また、バッテリー試験法での判定は、感度 I、感度 II ともに 100% であった。プロトコール改訂によって、前研究では疑陽性領域にあった物質に陽性判定が下されたため、更に特異度も改善されたことから、プロトコール改訂は有用であったと考えられた。陽性物質の阻止帯の差の施設間差がやや大きくなったことは、プロトコール改訂の一つの結果と考えられる。さらに、すべての施設（3 または 4 施設）で、バッテリー試験法での判定と *in vivo* の結果が一致したのは 9 物質中 5 物質で、前研究の 2 物質より多かった。

6. 試験法の正確性

本試験法が *in vitro* 光毒性スクリーニング法として、未知の化学物質に光毒性が存在するかどうかを容易に知ることができ、さらに評価法の最も重要な所要条件と考えられる疑陰性や疑陽性が少ないことも正確性に影響するが、とくに疑陰性すなわち陽性物質を陰性と誤って判断することが 100% ない実験方法である必要がある。さらに実験方法の結果が正確で頑健性があることが実験方法としての信頼性を大きく左右するものであると考えられる。一次バリデーション試験の結果では、施設内再現性は施設 b で特に悪く、さらに施設間再現性も 4 物質（Acridine、BMDM、CHD および Bithionol）を除いて結果が一致しなかった。一次バリデーション試験ではかなり大幅なデータクリーニングが必要であり、施設 b の結果を除外して疑陽性判定を陽性判定と見なした場合でも *in vivo* 判定との一致率は 70% であり大きくばらついた。一次バリデーション試験では全く不正確な結果であり試験プロトコールの見直しが必要であった。酵母光生育阻害試験の陽性結果の判定基準の変更やプレインキュベーション時間の設定等を行ない補完試験が実施された。補完試験のプロトコールでは疑陽性判定が少なくなり、施設内再現性および施設間再現性共に一次バリデーション試験に比して良好な結果が得られ正確性が向上した。

今回のバリデーションでそれぞれの試験結果の正確性に影響を及ぼす主な要因として、光源、評価基準、その他の項目に分けて考える。

6.1 光源

使用された光源の種類や強さは実験の正確性に大きな影響を与えると考えられる。当初本実験方法を資生堂(株)が開発した時点の光源はトランスイルミネーター (UVA) であったが、バリデーション試験では人工太陽光であるソーラーシミュレーター (SOL500、 Dr. Honle 社製) が使用された。こ

のソーラーシミュレーターでは太陽光と類似したスペクトル分布が得られ、UVB から可視光までの光波長も含まれている。さらに、照射線量についても、光源の変更に伴い変更が行われたが、酵母光生育阻害試験においては、最終的に阻止帯を明瞭化するために照射量を当初の $8.5/\text{cm}^2$ から $20\text{J}/\text{cm}^2$ としたことも実験の正確性の向上に貢献したものと考えられる。

各施設の実験環境が異なることから、第一次バリデーションの際にプロトコルに記載されていないことが相まって各施設独自の工夫がみられた。その中で光照射中に暗幕を使用した施設と使用しなかった施設があった。暗幕を用いれば反射により光照射の強度が上がり、さらに暗幕で密閉された状態で環境温度が上昇することが考えられ、温度上昇が細胞に与える影響も懸念された。そのため暗幕の有無も施設間におけるバラツキの原因の1つで、実験結果の正確性に影響することが考えられた。なお、プロトコルを改訂した補完試験では統一され、結果のバラツキが少なくなり、さらに導き出された結果が正確となったと考えられる。

6.2 評価基準

酵母光生育阻害試験では、第一次バリデーションでは、阻止帯の直径を 2mm 以上を陽性、2mm 未満を陰性とした。このため、陽性扱いとなった本来陰性であるべき物質も数多くみられ、これが一致率の低下を招いたことから、改訂されたプロトコルでは、5mm 以上を陽性、5mm 未満を陰性として補完試験を行った結果、一致率と施設間のバラツキの大幅な向上がみられた。また、陽性対照である 8-MOP の場合に $0.1\text{ mg}/\text{mL}$ では阻止帯が小さくはっきりしていないことから、明らかな阻止帯が観察された $1\text{ mg}/\text{mL}$ を陽性対照とし、陽性対照物質の試験条件として濃度 $1\text{ mg}/\text{mL}$ と設定することが結果の正確性に寄与したと考えられる。

6.3 その他

酵母光生育阻害試験の第一次バリデーションではプレインキュベーションの設定はなかったが、プレインキュベーションを行うことによって最終の阻止帯の差が大きくなることを見いだされた。その結果、プロトコルを改訂した補完試験ではプレインキュベーション時間を 5 時間と設定することが、阻止帯により明確な差をつけることができ、結果としてより正確な結論を導き出された。また、赤血球光溶血試験における吸光度測定における波長の影響についても、吸光度計の波長を 540nm の場合と 525nm の場合とを比較した結果、525nm での判定の方が感度、一致度の両面で良い結果が得られた。しかし、今回の補完試験プロトコルでは各施設の吸光度計のフィルター入手等の問題から 540nm が採用された。

一般的に実験の正確性に影響する要因として、酵母ならびに赤血球の種類やロットによるバラツキ、実験器具や材料の違いによるバラツキ、実験環境や実験者の習熟度、プロトコル遵守などが考えられる。改訂されたプロトコルではこれらの点も記載され、実験方法の結果の正確性に貢献していると考えられる。とくに、今回の第一次バリデーション結果と、補完後の最終結果を比較すると、正確性が向上していることが明らかである。補完実験の最終プロトコルによって、本法を用いて未知物質の光毒性を予知することが十分に可能であり他の方法による光毒性試験結果と正確性に劣らない方法であると結論づけられる。

7. 試験法の信頼性 (*in vivo* との比較)

陽性化合物 4 種と陰性化合物 5 種の計 9 種の化合物を用いた第一次バリデーションでは、データ解析から除外することが妥当と判断された 1 施設のデータを除き且つ疑陽性判定を陽性とみなした場合、感度は 100%、特異性は 47%、一致度は 70%をそれぞれ示した。また、判定基準あるいはプレインキュベーション時間等について見直しを行って実施された補完試験では、陽性対照の判定はすべての施設で陽性判定となる改善点が認められ、疑陽性は存在したものの、疑陰性は示されず、陽性化合物の見落としを少なくする改善が行われた。今回のバリデーションで用いられた化合物は 9 種類と限られており、当結果のみから *in vivo* の予測性を判断することは困難であるが、3T3-NRU 法に近い評価が可能な試験系であると言える。

最終的に整備されたプロトコールにおける検討物質数は 9 物質のみであり、本法が広範囲の被験物質に適用可能かどうか不明である。資生堂が過去の検討試験で用いた 24 物質程度（バリデーションが終了している物質を除く）を用いた追加検討を要望する。その上で、今後、当該試験系を用いてのデータが蓄積され、*in vivo* との相関性が保証されるまでは、一次スクリーニングとしての活用が望ましく、被験化合物の光毒性評価においては、動物試験の併用を考慮すべきと考えられる。また、経口投与等による全身暴露を考えた場合には、代謝活性化系の導入についても検討すべきと考えられる。

8. データの質

8.1 資生堂における検討試験

8.1.1 GLP 原則の遵守

施設が GLP 認定施設でないこと、プロトコールの様式が GLP に則っていない等の理由から、提出データは厳密に GLP に準拠して作成されたものとは言えない。しかし、試薬調製記録や試験結果等の生データが適正に記録・保管されており、今回の申請に際して生データが提出され、データの追跡解析は可能であった。また、データの修正手続きについては通常の GLP 試験と同様に行われていた。これらのことから施設内バリデーションは「GLP 精神に準じて、試験が実施された」と見なしてよいと考えられた。

8.1.2 プロトコール違反

赤血球光溶血試験のまとめのデータには被験物質ごとに 3 回の試験結果しか示されていなかったが、実際にはより多くの試験が行われていたとの問題点が指摘された。この理由について提案者はデータに食い違いが生じた時は実験を繰り返し、3 回同じ結果が出た時点で終了すると決められていたと回答した。本件は試験の信頼性に影響を与えるべきものであり、また、3 回同じ判定結果が出た時に終了するとのことは試験法プロトコールにも明記されていなかった。しかし、事前に提出された個別データ中にそれら採用されなかったデータも含まれており、恣意的に隠したものではないとされた。また、このようにすると 3 回の試験結果の平均を取って評価するというプロトコールが意味を持たなくなる。そこで、多施設バリデーションの際には正当な理由がない限り行った試験結果すべてを採用すべきであると指摘された。また、繰り返し試験の結果は平均して評価することをプロトコールに明確に記載すべきであるとされた。

8.1.3 その他、試験実施上の問題点等

提案施設は光毒性試験について長い経験があり、担当者も十分な経験を受けたものであり、技術的には問題ないと考えられる。

8.1.4 データの信頼性

生データと個別データ、まとめの結果と対比については、多くのデータについて二次データとの相関性が確認されたことから、データの信頼性に問題はないと考えられた。

8.2 一次バリデーション試験

8.2.1 GLP 原則の遵守

試験実施前に GLP についての基本的な事項を説明したが、試験結果には多くの記載ミスや転記ミスがあった。これらはデータ整理担当者レベルで確認され、被験物質コードの開示前に修正されたこと、また、全ての生データ或いはそのコピーを事務局に提出してもらったことから、適正に処理され、データの信頼性には問題ないとする。また、GLP 施設からのデータにはこれらのミスは少なかったことから、GLP 施設でないところには、試験開始前に GLP 教育をより徹底することや、あるいはバリデーション参加施設を GLP 施設のみに絞るか、または安全性試験を GLP 原則に則って実施してきた施設のみに絞ることも必要かもしれないとの意見も出た。なお、実際に GLP 施設のみにすることはバリデーション参加者がかなり減少し、受託機関のみになってしまう可能性もあり現状では困難と思われた。

8.2.2 プロトコール違反

プロトコール違反をどう扱うかについて、バリデーション委員会で審議された。その結果、単純な試験濃度ミス・測定ミスがある記載データについては、明らかなミスと判断できるデータを削除した上で採用されている。

8.2.3 その他、試験実施上の問題点等

施設内のバラツキが特定の施設に大きかったことから、予備的なバリデーションを実施し、参加希望施設の技術レベルを確認することが必要であろう。また、今回の試験法では、光源の特長の把握等が必要であったことや、試験法の詳細についての知見が重要であったことから、プロトコールの精緻化の重要性と参加施設の技術レベルの確認が必要であることが示唆された。

8.2.4 データの信頼性

技術上の問題はあったが、データクリーニングを行い、生データとの突合せを実施したことから、最終的なデータの信頼性は高いと思われる。

8.3 補完試験

補完試験に参加した 5 施設は、いずれも一次バリデーション試験に参加し、酵素光生育阻害実験のデータについて評価を受けた経験を有することから、技術的な側面からデータの質への懸念はないものと考えられた。光毒性試験代替法バリデーション報告書（2008 年 1 月 7 日）の「3-6 実験条件の記録」に、実験は GLP の精神に則って実施され、定められた様式で、測定機器や実験条件を記録したと記載されている。さらに、一次バリデーション試験では多くの記載ミスや転記ミスがあったが、補完試験では一次バリデーション試験の経験を生かしてデータシートを改善した結果、転記ミスが 2 件のみに減少したことから、補完実験のデータの信頼性に問題はなかったと考えられた。補完試験後の中間報告会において、阻止円の測り方をプロトコールに文章として記載したほうが良いとの意見が出され、プロトコールの改訂がなされたことから、データに影響する要因について適切な対応がなされているものと考えられた。

9. 他の科学的な報告

バッテリー試験法に関わる 2 報の論文について、以下に記述する。

9.1 A Strategic Approach for Predicting Phototoxicity of Cosmetic Ingredients

Altern. Animal Test. Experiment., 9(1), 29-39 (2002)

赤血球光溶血試験法、酵母光生育阻害試験法および 3T3-NRU 光毒性試験法についての評価を行うとともに、それぞれの試験法を組み合わせた時の予測性についても評価を行った。実験では、*in vivo* で陽性を示す化合物 9 種および陰性を示す化合物 14 種の計 23 種の化合物を用いた。実験の結果、酵母光生育阻害試験法が最もモルモットを用いた *in vivo* 試験の成績と一致する結果を示した (表 17)。各試験法それぞれに疑陰性が認められたが、赤血球光溶血試験法と酵母光生育阻害試験法を組み合わせたバッテリー試験法では、疑陰性を除外することが可能であった (表 17)。

さらに、赤血球光溶血試験法、酵母光生育阻害試験法および 3T3 NR 光毒性試験法のそれぞれの組み合わせによる光毒性評価について検討を行った。赤血球光溶血試験法と酵母光生育阻害試験法、3T3-NRU 光毒性試験法と赤血球光溶血試験法の組み合わせの評価では、単独での評価で見られた疑陰性を除外することができた (表 18)。

以上、異なるメカニズムによる光毒性発現を検出する試験法を組み合わせることにより、予測性の向上が認められた。また、水難溶性化合物の評価が可能な点を含めると、赤血球光溶血試験法と酵母光生育阻害試験法を組み合わせたバッテリー試験法の有用性が示されたものと考えられる。

表 17 Evaluation of *in vitro* methods in terms of five parameters

Parameter	RBC assay	Yeast assay	NRU PT	Battery system
			using BALB/3T3 clone A31	RBC-Yeast
Sensitivity	67%	89%	67%	100%
Specificity	71%	79%	79%	64%
Predictive value (+)	60%	73%	67%	64%
Predictive value (-)	77%	92%	79%	100%
Equivalence	70%	80%	72%	76%
False negative	8-MOP	Phantolid	Phantolid	-
	5-MOP		Galaxolide	
			TCSA	

表 18 Evaluation of the three battery systems

Parameter	Battery system		
	RBC-Yeast	Yeast-NRU PT	NRU PT-RBC
Sensitivity	100%	89%	100%
Specificity	64%	73%	64%
Predictive value (+)	64%	67%	64%
Predictive value (-)	100%	92%	100%
Equivalence	76%	83%	76%
False negative	-	Phantolid	-

9.2 Effects of Light Sources on the Prediction of Phototoxicity by the Yeast Growth Inhibition Phototoxicity Assay and the Red Blood Cell Photohemolysis Assay

Altern. Animal Test. Experiment., 10(1), 1-17 (2004)

赤血球光溶血試験法、酵母光生育阻害試験法およびバッテリー試験法において、光源の差異が試験成績に及ぼす影響を検討した。実験では、24種の化合物を用いた。光源は、solar simulator と UVA 照射器を用いた。いずれの試験法においても、光源の違いによる試験成績へ影響は認められなかった (表 19)。

表 19 Availability of the battery system in terms of correlation parameters.

Parameters *	YGI PT (%)		RBC PH (%)		Battery system (%)	
	Solar	UVA	Solar	UVA	Solar	UVA
Sensitivity	78	89	67	67	100	100
Specificity	87	80	73	73	73	67
Predictive value (+)	78	73	60	60	69	64
Predictive value (-)	87	92	79	79	100	100
Equivalence	81	81	71	73	81	77

Correlation parameters were calculated using the data for 24 cosmetic ingredients in Table 4.

*: Parameters reported by Balls *et al.* (1990).

Solar simulator を光源とし、赤血球光溶血試験法、酵母光生育阻害試験法、バッテリー試験法および 3T3-NRU 光毒性試験法の比較を行った。なお、3T3-NRU 光毒性試験法のデータは EU/COLIPA で実施されたバリデーションの結果を用いた。検討の結果、2種の試験法を組み合わせることにより (バッテリー試験法)、単独での評価に比較して光毒性予測力が向上することが認められた。また、バッテリー試験法は、3T3-NRU 光毒性試験法と同等の光毒性予測力を持つことが示された。

表 20 Comparison of correlation parameters for the YGI PT assay, the RBC PH assay and the battery system with the use of the solar simulator.

Parameters *	YGI PT (%)	RBC PH (%)	Battery system (%)	3T3 NRU PT (%)
Sensitivity	83	67	100	100
Specificity	75	63	63	50
Predictive value (+)	71	57	67	60
Predictive value (-)	86	71	100	100
Equivalence	79	64	79	71

Correlation parameters were calculated using the data for 14 chemicals in Table 4, *i.e.*, musk ambrette, 8-MOP, 5-MOP, 6-MC, EHMC, HMB, HMBS, piroxicam, CPZ, bithionol, TCSA, rose bengal, acridine and anthracene.

*: Parameters reported by Balls *et al.* (1990).

10. 3Rs への対応

酵母光生育阻害試験については、動物を使用しないことから、動物福祉面から代替法として、問題ないものとする。赤血球光溶血性試験ではヒツジの血液を用いている。ヒツジの血液については、ヒトの血液での代用可能性もあるが、本試験にて、陽性対照物質と 3 被験物質を評価する場合に必要なヒツジ赤血球量は血液約 2mL である。供血用動物の健康面、福祉面に適切な配慮がなされれば、

同一動物から間隔を空けて繰り返し採血することは可能であり、動物福祉面で特段の問題はないものと考えられた。

11. 試験法の有用性と限界（コスト、時間面からの妥当性など）

試験系である緬羊保存血ならびにドライイーストとも高価ではなく、光源装置を除くと、高価で特殊な機器や試薬等は必要としないことから、本試験法はコスト面で特に問題はないものと考えられた。また、3T3-NRU 法は水に難溶性の物質では評価結果にバラツキが大きくなる可能性が示されているが、本試験法は水に難溶性の物質に対応できる方法として、提案されている。さらに、本試験法は必ずしもクリーンベンチでの操作を必要としない簡便な方法であることから、技術のトランスファーは比較的容易と考えられた。しかしながら、酵母試験における非水溶性物質の評価については更に検討が必要とのことから、水に難溶性の物質への対応可能性を本試験法の有用性の根拠することについては明確ではないものと考えられた。よって、少なくとも4水難溶性物質を用いたバリデーションの実施を要望する。

本試験法の実施に費やす時間は、個々の試験はいずれも1日以内であるが、バッテリー試験法であり、単独の試験では陰性結果を判定できないことから、単独の試験結果で評価する3T3-NRU法より、時間を要する。いずれの試験系も陽性対照物質が設定されていることから大きな問題ではないが、緬羊保存血やドライイーストの反応性のロット間差の有無やドライイーストの保存条件や期間の試験データへの影響について、SOP等で言及する必要性について、考慮すべきと考えられた。

提案のバッテリー試験法を受け入れる条件として、3T3-NRU法単独よりバッテリー試験法が優位な一致性を示す必要があるのか、それとも一致性が同等であっても、他のメリットがあれば、良いのかについて、多施設バリデーション開始前に本試験法の評価委員会による一次評価において検討され、同等ならば、受け入れても良いとの見解が示されている。よって、評価委員会が指摘した点に対応した改訂プロトコルを用いた追加バリデーションにより、3T3-NRU法と同等の感度であること、結果が安定していることが示されるなら、試験法として有用であるものと考えられる。

12. その他（特許の有無など）

本試験法に関する特許は申請されていない。

なお、本評価書のパブリックコメントにおいて、提案者より添付1のような質問を受け、添付2のような回答を評価者が返すとともに、本報告書にも必要なと思われる内容を追記した。

13. 文献

OECD Guidance for Testing of Chemicals: 432, In vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, OECD/OCED., 13 April 2004

大野泰雄ら、Balb/c 3T3 細胞を用い Neutral red 取り込みを指標とした光毒性代替法の評価結果報告 Altern. Animal Test. Experiment., 10(2), 50-157 (2004)

Sugiyama M. et al., A Strategic Approach for Predicting Phototoxicity of Cosmetic Ingredients. Altern. Animal Test. Experiment., 9(1), 29-39 (2002)

Mori M. et al., Effects of Light Sources on the Prediction of Phototoxicity by the Yeast Growth Inhibition Phototoxicity Assay and the Red Blood Cell Photohemolysis Assay. Altern. Animal Test. Experiment., 10(1), 1-17 (2004)

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる 光毒性試験代替法の第三者評価報告書に対するコメント

- ①試験法のメリットの一つと考えられている水難溶性物質の評価が十分に行われていない。
難水溶性物質の評価について物質がどれだけあれば十分と言えるか数を示していただきたい(板垣)。
- ②最終的に整備されたプロトコルにおける検討物質数は 9 物質のみであり、本法が広範囲の被験物質に適用可能かどうか不明である。
本件も受け入れ可能な必要最小限の被験物質数を示して結論付けるべきと考える(板垣)。
- ③3T3-NRU 法との直接比較がなされておらず、同等性あるいは優越性が明確に示されていない。
3T3-NRU 法との比較は投稿論文に記載している。バリデーションでも直接比較を行うべきと考えるのか評価委員会の見解を示していただきたい(板垣)。
- ④異なる光源を使用した際の結果の安定性について評価されていない。
評価委員会はバリデーション結果の評価が目的と考える。SOP で記載していない異なる光源のデータを要求する根拠を示していただきたい(板垣)。
- ⑤温度上昇による結果の差異が言及されているが、この点に関する追加検討が実施されていない。
暗幕の有無による温度上昇に関する追加検討のうえ、SOP を変更したのであるが、さらに必要な追加検討項目を示していただきたい(板垣)。
- ⑥代謝活性化系が設定されていないため、経皮投与以外の全身曝露の際の安全性が評価できない。
本試験法は化粧品や医薬部外品等の外用剤のための光毒性試験として提案している。ご参考までに提出した SOP には、『1. 適用範囲 化粧品、医薬部外品に用いられる基材、薬剤、色素、香料などのうち、紫外部吸収(280nm~400nm)が認められるものに適用する。』と規定している。また OECD ガイドラインに採択された 3T3-NRU についても代謝活性化の系は設定されておらず、評価委員会の主張される全身曝露の際の安全性は評価できないものとするが如何か(板垣)。
- ⑦バッテリーの 2 試験の実施順序を規定する必要性に関する検討がなされていない。

バッテリー法の実施順序に関しては、提案資料 9-2(論文:AATEX, 2, 193-202 (1994).)に記載されている。要旨は適用範囲が広く in vivo との対応性が良い酵母光生育阻害試験を第一次試験とし、その結果が陰性の場合、酵母光生育阻害試験では捉えられない膜破壊を観察する赤血球光溶血試験を実施することとした。この内容は評価フローとして、技術講習会や評価委員会の説明会でもお話している(板垣)。

⑧酵母光生育阻害試験における陽性判定のカットオフ値について再検討の余地がある。

カットオフ値の再検討について記載されているのは、第一次バリデーションの報告書である。補完試験の報告書には、『SOP 改訂の妥当性が確認できたものと考えられる。陽性物質では施設間差がみられたが、陰性物質と判定された物質には大きな施設間差はみられなかった。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のと考えられる。』と記載されており、カットオフ値の再検討について記載されていないが、再検討すべき項目とそれが評価に及ぼす影響を示していただきたい(板垣)。

⑨赤血球光溶血試験の吸光度測定波長の選定に再検討の余地がある。

赤血球光溶血試験は通常、540nm か 525nm で実施されている。再検討すべき項目とそれが評価に及ぼす影響を示していただきたい(板垣)。